(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2021年6月10日(10.06.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/112249 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 19/00 (2006.01) *C12P 21/02* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2020/045327

(22) 国際出願日： 2020年12月4日(04.12.2020)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2019-221040 2019年12月6日(06.12.2019) JP

(71) 出願人: 味の素株式会社 (**AJINOMOTO CO., INC.**) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目１５番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 伊藤 健一郎(**ITO Kenichiro**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 松田 吉彦(**MATSUDA Yoshihiko**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 山田 奈緒子(**YAMADA Naoko**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 菊池 慶実(**KIKUCHI Yoshimi**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 小西 敦(**KONISHI Atsushi**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 神崎 道哉(**KANZAKI Michiya**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 高橋 一敏(**TAKAHASHI Kazutoshi**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 山口 浩輝(**YAMAGUCHI Hiroki**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 藤原 亜矢子(**FUJIWARA Ayako**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 宮入 匡平(**MIYAIRI Kyohei**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 田中 伸一郎, 外 (**TANAKA Shinichiro et al.**); 〒1008355 東京都千代田区丸の内３丁目３番１号 新東京ビル 中村合同特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

WO 2021/112249 A1

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING PEPTIDE HAVING PHYSIOLOGICAL ACTIVITY, AND PEPTIDE COMPRISING SHORT LINKER

(54) 発明の名称： 生理活性を有するペプチドの製造方法及び短鎖リンカーを含むペプチド

(57) **Abstract:** Provided are: a method for producing a complicated peptide molecule, such as a dimeric peptide, in a simpler manner at lower cost compared with the conventional chemical synthesis methods; a dimeric peptide which comprises a specific short linker and has a satisfactory activity; and others.

(57) 要約：ダイマーペプチド等の複雑なペプチド分子を、従来の化学合成手法と比較して簡便かつ安価に製造する方法や、特定の短鎖リンカーを含む良好な活性を有するダイマーペプチド等を提供する。

明　細　書

発明の名称 ：

生理活性を有するペプチドの製造方法及び短鎖リンカーを含むペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、生理活性を有するペプチドの製造方法及び短鎖リンカーを含むペプチド等に関する。

背景技術

[0002] 近年、医薬のモダリティとして、抗体医薬等のバイオ医薬品、再生医療、核酸医薬等が研究され、実際に用いられるようになってきた。また、新しい医薬のモダリティとして、中分子、特にペプチドが着目されている。特に、環状ペプチド等の特殊な形状のペプチド（特殊ペプチド）が複数開発されており、医薬への応用が期待されるところである。

そのような状況下、ダイマーペプチドやペプチド複合体の開発が今後加速すると考えられる。例えば、ダイマーペプチドに関しては、Apellis PharmaceuticalsのAPL-2が、加齢黄斑変性症等の治療薬として臨床研究されており、実用化が期待されている。

[0003] ダイマーペプチドは、２つのペプチド鎖を短鎖リンカーで連結する構造を有し、また、ペプチド複合体は、ペプチド鎖と薬物を短鎖リンカーで連結する構造を有するのが一般的である。このような短鎖リンカーとしては、PEGリンカーが主に用いられている。

しかしながら、ダイマーペプチドやペプチド複合体の製造において、従来の化学合成手法では、ペプチド鎖の化学合成、PEGリンカーの付加、及び精製を行う必要があり、多くの製造工程を経る必要があった。また、ペプチドが環状ペプチドである場合には、更にペプチド鎖の環状化を行わなければならない。そのため、ダイマーペプチドやペプチド複合体を従来の化学合成手法で製造するには、複雑な工程を経る必要があり、非常に手間がかかっていた。その上、従来の化学合成手法では、第１のペプチドと第２のペプチドをPEG

リンカーを介して結合させてなるダイマーペプチドの合成において、第１のペプチドのＣ末端がリンカーに結合し、第２のペプチドについてもＣ末端がリンカーに結合するものが得られ、第１のペプチドのＣ末端がリンカーに結合し、第２のペプチドのＮ末端がリンカーに結合するようなダイマーペプチドの効率的な合成は行うことができない。

加えて、主に使用されているPEGリンカーが高価であり、従来の化学合成手法では経済的にも好ましいとは言えない。

[0004] 特表２０１３－５３１４８０には、生物学的に活性なタンパク質と、少なくとも５０個のプロリンおよびアラニンのアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むランダムコイルポリペプチドとを含む、薬物コンジュゲートが記載されている。特許文献１においては、当該ランダムコイルポリペプチドが、薬物コンジュゲートの増加した血中安定性をもたらすことが記載されている。

しかしながら、特表２０１３－５３１４８０には、当該ランダムコイルポリペプチドを、ダイマーペプチドやペプチド複合体におけるPEGリンカーのような短鎖リンカーの代わりに用いることについての具体的な開示はない。

また、ダイマーペプチド等のペプチド分子を医薬として利用するには、ダイマーペプチド等のペプチド分子の安定性の向上だけでなく、活性の維持又は向上も望まれる。２つのペプチド鎖を連結する短鎖リンカーとしてPEGリンカーが主に用いられていること、及びPEGリンカーの使用には製造面での課題が存在することは上記のとおりであるが、ダイマーペプチド等のペプチド分子の活性の観点からも、より有用な短鎖リンカーについて切望されているところである。

発明の概要

[0005] 上述のとおり、ダイマーペプチド等のペプチド分子の製造において、従来の化学合成手法では、操作が簡便ではなく、必要な費用も高額であった。

そこで、本発明の一態様では、ダイマーペプチド等のペプチド分子を、従来の化学合成手法と比較して簡便かつ安価に製造する方法を提供することを

目的とする。

[0006] ２つのペプチド鎖を連結する短鎖リンカーとして、ダイマーペプチド等のペプチド分子の活性の観点から、より有用な短鎖リンカーが望まれることは上記のとおりである。

そこで、本発明の一態様では、特定の短鎖リンカーを含む良好な活性を有するダイマーペプチド等のペプチド分子を提供することを目的とする。

[0007] 本発明は、例えば、以下の態様を含み得る。

〔１〕（I）第１の生理活性ペプチド部位と、

（II）４９個以下のアミノ酸残基からなるリンカー部位と、

（III）前記リンカー部位を介して前記第１の生理活性ペプチド部位とは反対側に位置する第２の生理活性ペプチド部位と

を含むペプチド分子であって、

前記第１の生理活性ペプチド部位と前記第２の生理活性ペプチド部位が、互いに同じであっても異なっていてもよく、

前記リンカー部位のアミノ酸配列の少なくとも９０％がアラニン（A）、プロリン（P）及びセリン（S）から選択されるアミノ酸残基からなる、前記ペプチド分子。

〔２〕前記第１の生理活性ペプチド部位が環状ペプチドを構成している、及び／又は前記第２の生理活性ペプチド部位が環状ペプチドを構成している、前記〔１〕に記載のペプチド分子。

〔３〕前記第１の生理活性ペプチド部位が、ジスルフィド結合により環状構造が形成された環状ペプチドを構成している、及び／又は前記第２の生理活性ペプチド部位が、ジスルフィド結合により環状構造が形成された環状ペプチドを構成している、前記〔１〕又は〔２〕に記載のペプチド分子。

〔４〕前記第１の生理活性ペプチド部位と前記第２の生理活性ペプチド部位が、それぞれ、c-Metタンパク質に結合する環状ペプチドを構成しており、互いに同じであっても異なっていてもよい、前記〔１〕～〔３〕のいずれか１項に記載のペプチド分子。

〔５〕前記環状ペプチドが、以下の（a）～（i）から選択されるアミノ酸配列を含む、ジスルフィド結合により環状構造を形成している環状ペプチドである、前記〔４〕に記載のペプチド分子。

（a）CYRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：１）；

（b）CRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：２）；

（c）CYWYYAWDQTYKAFPC（配列番号：３）；

（d）CWYYAWDQTYKAFPC（配列番号：４）；

（e）CYISWNEFNSPNWRFITC（配列番号：５）；

（f）CISWNEFNSPNWRFITC（配列番号：６）；

（g）（a）～（f）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の１又は２個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されており、かつc-Metタンパク質に結合するペプチド；

（h）（a）～（f）のいずれかのアミノ酸配列と90％以上の配列同一性を有し、但し両端のシステイン残基を有しているアミノ酸配列からなり、かつc-Metタンパク質に結合するペプチド；及び

（i）（a）～（h）のいずれかのアミノ酸配列において、両端のシステイン残基以外の少なくとも１つのアミノ酸が修飾されているペプチド（アミノ酸の修飾は、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニリル化、ADPリボシル化又は糖鎖付加である。）

〔６〕前記第１の生理活性ペプチド部位と前記第２の生理活性ペプチド部位が、それぞれ、エリスロポエチン受容体に結合する環状ペプチドを構成しており、互いに同じであっても異なっていてもよい、前記〔１〕～〔３〕のいずれか１項に記載のペプチド分子。

〔７〕前記環状ペプチドが、以下の（j）～（n）から選択されるアミノ酸配列を含む、ジスルフィド結合により環状構造を形成している環状ペプチドである、前記〔６〕に記載のペプチド分子。

（j）GGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：６５）；

（k）CISWNEFNSPNWRFITC（配列番号：６６）；

（l）（j）又は（k）のアミノ酸配列において、システイン残基以外の１又は２個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されており、かつエリスロポエチン受容体に結合するペプチド；

（m）（j）又は（k）のいずれかのアミノ酸配列と90％以上の配列同一性を有し、但しシステイン残基を（j）又は（k）におけるそのままの位置で有しているアミノ酸配列からなり、かつエリスロポエチン受容体に結合するペプチド；及び

（n）（j）～（m）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の少なくとも１つのアミノ酸が修飾されているペプチド（アミノ酸の修飾は、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニリル化、ADPリボシル化又は糖鎖付加である。）

〔８〕前記第１の生理活性ペプチド部位と前記第２の生理活性ペプチド部位が、それぞれ、トロンボポエチン受容体に結合する生理活性ペプチドからなり、互いに同じであっても異なっていてもよい、前記〔１〕～〔３〕のいずれか１項に記載のペプチド分子。

〔９〕前記生理活性ペプチドが、以下の（o）～（u）から選択されるアミノ酸配列を含む、前記〔８〕に記載のペプチド分子。

（o）IEGPTLRQWLAARA（配列番号：６７）；

（p）GGCADGPTLREWISFCGG（配列番号：６８）；

（q）GGCTLREWLHGGFCGG（配列番号：６９）；

（r）LAIEGPTLRQWLHGNGRDT（配列番号：７０）；

（s）（o）～（r）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の１又は２個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されており、かつトロンボポエチン受容体に結合するペプチド；

（t）（o）～（r）のいずれかのアミノ酸配列と90％以上の配列同一性を有し、但し（p）又は（q）を基準とする場合にはシステイン残基を（p）又は（q）におけるそのままの位置で有しているアミノ酸配列からなり、かつトロンボポエチン受容体に結合するペプチド；及び

（u）（o）～（t）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の少なくとも１つのアミノ酸が修飾されているペプチド（アミノ酸の修飾は、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニリル化、ADPリボシル化又は糖鎖付加である。）

〔１０〕前記リンカー部位（II）と隣接しない位置で、機能性修飾部位を更に含む、前記〔１〕～〔９〕のいずれか１項に記載のペプチド分子。

〔１１〕前記リンカー部位（II）が第１のリンカー部位であり、

前記第２の生理活性ペプチド部位の、前記第１のリンカー部位とは反対側に第２のリンカー部位を更に含み、

前記第２のリンカー部位を介して前記第２の生理活性ペプチド部位とは反対側に位置する第３の生理活性ペプチド部位を更に含み、

前記第３の生理活性ペプチド部位が、前記第１の生理活性ペプチド部位及び／又は前記第２の生理活性ペプチド部位と同じであっても異なっていてもよく、

前記第２のリンカー部位が、４９個以下のアミノ酸残基からなり、そのアミノ酸配列の少なくとも９０％がアラニン（A）、プロリン（P）及びセリン（S）から選択されるアミノ酸残基からなり、前記第１のリンカー部位と同じであっても異なっていてもよい、前記〔１〕～〔１０〕のいずれか１項に記載のペプチド分子。

〔１２〕前記リンカー部位（II）が、AP、AAP、AS、ASP及びASSからなる群から選択されるアミノ酸配列を２つ以上繰り返して含み、かつ第２のリンカー部位が存在する場合には、当該第２のリンカー部位が、AP、AAP、AS、ASP及びASSからなる群から選択されるアミノ酸配列を２つ以上繰り返して含む、前記〔１〕～〔１１〕のいずれか１項に記載のペプチド分子。

〔１３〕ペプチド分子の製造方法であって、

前記ペプチド分子をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞において前記ポリヌクレオチドを発現させること、又は前記ペプチド分子をコードするポリヌクレオチドを無細胞発現系において発現させることにより、前記ペ

プチド分子を生成する工程、

を含み、

前記ペプチド分子が、（I）第１の生理活性ペプチド部位と、（II）アミノ酸残基からなるリンカー部位と、（III）前記リンカー部位を介して前記第１の生理活性ペプチド部位とは反対側に位置する、第２の生理活性ペプチド部位及び／又は少なくとも１つのアミノ酸残基からなる付加アミノ酸配列とを含み、

前記第１の生理活性ペプチド部位と前記第２の生理活性ペプチド部位が、それぞれ、分子量10,000以下であり、かつ５０個以下のアミノ酸残基からなり、互いに同じであっても異なっていてもよく、

前記付加アミノ酸配列が、分子量10,000以下であり、かつ５０個以下のアミノ酸残基からなる、前記製造方法。

〔１４〕前記第１の生理活性ペプチド部位が環状ペプチドを構成している、及び／又は前記第２の生理活性ペプチド部位が環状ペプチドを構成している、前記〔１３〕に記載の製造方法。

〔１５〕ペプチド分子の製造方法であって、

前記ペプチド分子をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞において前記ポリヌクレオチドを発現させること、又は前記ペプチド分子をコードするポリヌクレオチドを無細胞発現系において発現させることにより、前記ペプチド分子を生成する工程、

を含み、

前記ペプチド分子が、（I）環状ペプチドを構成している第１の生理活性ペプチド部位と、（II）アミノ酸残基からなるリンカー部位と、（III）前記リンカー部位を介して前記第１の生理活性ペプチド部位とは反対側に位置する、第２の生理活性ペプチド部位及び／又は少なくとも１つのアミノ酸残基からなる付加アミノ酸配列とを含み、

前記第１の生理活性ペプチド部位と前記第２の生理活性ペプチド部位が、互いに同じであっても異なっていてもよく、

前記付加アミノ酸配列が、分子量10,000以下であり、かつ５０個以下のアミノ酸残基からなる、前記製造方法。

〔１６〕前記ペプチド分子が、前記第２の生理活性ペプチド部位を含み、かつ前記第２の生理活性ペプチド部位が、環状ペプチドを構成している、前記〔１５〕に記載の製造方法。

〔１７〕前記リンカー部位が、分子量10,000以下であり、かつ５０個以下のアミノ酸残基からなる、前記〔１３〕～〔１６〕のいずれか１項に記載の製造方法。

〔１８〕前記リンカー部位が、分子量10,000以下であり、かつ４９個以下のアミノ酸残基からなるリンカー部位であって、そのアミノ酸配列の少なくとも９０％がアラニン（A）、プロリン（P）及びセリン（S）から選択されるアミノ酸残基からなる、前記〔１３〕～〔１６〕のいずれか１項に記載の製造方法。

〔１９〕前記リンカー部位が、AP、AAP、AS、ASP及びASSからなる群から選択されるアミノ酸配列を２つ以上繰り返して含む、前記〔１３〕～〔１８〕のいずれか１項に記載の製造方法。

[0008] 本発明の一実施態様によれば、ダイマーペプチド等のペプチド分子を、従来の化学合成手法と比較して簡便かつ安価に製造することができる。

本発明の一実施態様によれば、第１のペプチドのＣ末端がリンカーに結合し、第２のペプチドのＮ末端がリンカーに結合するようなダイマーペプチドの効率的な合成を行うことができる。

本発明の一実施態様によれば、良好な活性を有するダイマーペプチドを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]C. glutamicumにおけるダイマーペプチド（FBP-PAS）の分泌発現を示す、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果である。レーン１は、マーカー（XL-Ladder Broad、APRO science）であり、レーン２～５は、pPK10_TorAss-FBP-PASを用いたもの、レーン６は、pPK10（空ベクター）を用いたものである

。

[図2]MALDI-TOF-MSによるダイマーペプチド（FBP-PAS）の測定結果である。図中の分子模式図は、FBP-PASダイマーペプチドを示し、中央部分（色なし）がPASを表し、その両側部分（色付き）がFBPを表す。

[図3]モノマーペプチド（FBP）とダイマーペプチド（FBP-PAS）の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的受容体活性を表し、横軸はbFGF濃度を表す。図中の分子模式図において、色なし部分がPASを表し、色付き部分がFBPを表す。

[図4]C. glutamicumにおけるダイマーペプチド（HGF-PAS）の分泌発現を示す、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果である。レーン１は、マーカー（XL-Ladder Broad、APRO science）であり、レーン２～５は、pPK10_TorAss-PAS-aMD4-PEG11を用いたもの、レーン６～９は、pPK10_TorAss-PAS-aMD4dY-PEG11を用いたもの、レーン１０～１３は、pPK10_TorAss-PAS-aMD4-PEG3を用いたもの、レーン１４は、pPK10（空ベクター）を用いたものである。

[図5]C. glutamicumにおけるダイマーペプチド（HGF-PAS）の分泌発現を示す、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果である。レーン１は、マーカー（XL-Ladder Broad、APRO science）であり、レーン２～５は、pPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4-PEG11を用いたもの、レーン６～９は、pPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4dY-PEG11を用いたもの、レーン１０～１３は、pPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4-PEG3を用いたもの、レーン１４は、pPK4（空ベクター）を用いたものである。

[図6]MALDI-TOF-MSによるダイマーペプチド（HGF-PAS）の測定結果である。

[図7]HGFとダイマーペプチド（HGF-PAS）の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的受容体活性を表し、横軸は濃度を表す。

[図8]HGFとダイマーペプチド（HGF-PAS）の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的受容体活性を表し、横軸は濃度を表す。

[図9]HGFとダイマーペプチド（HGF-PAS）の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的受容体活性を表し、横軸はHGFについて濃度を表し、ダイマーペプチド（HGF-PAS）については、活性評価に供した培地に対し10倍希釈のダイマ

ーペプチド（HGF-PAS）を含む培養上清を用いたものである。

[図10]Proteome Profiler Human Phospho-RTK Array Kit（R&D Systems）を用いて、ダイマーペプチド（HGF-PAS）の受容体チロシンキナーゼ（RTK）特異性を評価した図である。ダイマーペプチド（HGF-PAS）はMet（HGF受容体）特異性を示すことが確認されている。

[図11]Proteome Profiler Human Phospho-RTK Array Kit（R&D Systems）の各アレイを示す図である。

[図12]HGFとダイマーペプチド（HGF-PAS）の細胞増殖促進活性の評価を示すグラフである。縦軸は生細胞数を表す。

[図13]HGFとダイマーペプチド（HGF-PAS）の細胞遊走活性の評価における顕微鏡写真図である。

[図14]HGFとダイマーペプチド（HGF-PAS）の細胞遊走活性の評価を示すグラフである。縦軸は相対的移動効率を表す。

[図15]HGFとダイマーペプチド（HGF-PAS）の創傷治癒効果の評価において細胞観察装置により撮影した写真図である。

[図16]HGFとダイマーペプチド（HGF-PAS）の創傷治癒効果の評価を示すグラフである。縦軸は創傷治癒速度を表す。

[図17]HGFとダイマーペプチド（HGF-PAS）の管状構造形成効果の評価における顕微鏡写真図である。スケールバーは、500 μmを表す。

[図18]C. glutamicumにおけるヘテロダイマーペプチド（HGF-PAS）の分泌発現を示す、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果である。レーン１は、マーカー（XL-Ladder Broad、APRO science）であり、レーン２～５は、pPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4_aMD5-PEG11を用いたもの、レーン６は、pPK4（空ベクター）を用いたものである。

[図19]MALDI-TOF-MSによるヘテロダイマーペプチド（HGF-PAS）の測定結果である。

[図20]C. glutamicumにおけるダイマーペプチド（HGF-PAS、HGF-GS）の分泌発現を示す、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果である。レーン１は、

マーカー（XL-Ladder Broad、APRO science）であり、レーン２は、pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-GS15を用いたもの、レーン３は、pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-GS22を用いたもの、レーン４は、pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS8を用いたもの、レーン５は、pPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4dY-PEG11を用いたもの、レーン６は、pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS49を用いたもの、レーン７は、pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS100を用いたもの、レーン８は、pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS200を用いたもの、レーン９は、pPK4（空ベクター）を用いたものである。

[図21]LC-MSによるダイマーペプチド（HGF-GS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図22]LC-MSによるダイマーペプチド（HGF-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図23]LC-MSによるダイマーペプチド（HGF-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図24]LC-MSによるダイマーペプチド（HGF-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図25]LC-MSによるダイマーペプチド（HGF-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図26]LC-MSによるダイマーペプチド（HGF-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図27]HGFとダイマーペプチド（HGF-PAS）の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的受容体活性を表し、横軸は、HGFに関しては濃度を表し、ダイマーペプチド（HGF-PAS）に関しては、活性評価に供した培地に対するダイマーペプチド（HGF-PAS）を含む培養上清の希釈率を表す。横軸におけるPAS8、PAS22、PAS49、PAS100、及びPAS200は、それぞれ、AET-aMD4dY-PAS8、AET-aMD4dY-PAS22（AET-PAS-aMD4dY-PEG11と同じである。）、AET-aMD4dY-PAS49、AET-aMD4dY-PAS100、及びAET-aMD4dY-PAS200を表す。Emptyは空ベクターを用いた結果であり、ダイマーペプチドを含む培養上清を用いた場合と同様に活性評価に供した培地に対する希釈率を表す。

[図28]HGFとダイマーペプチド（HGF-GS）の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的受容体活性を表し、横軸は、HGFに関しては濃度を表し、ダイマーペプチド（HGF-GS）に関しては、活性評価に供した培地に対するダイマーペプチド（HGF-PAS）を含む培養上清の希釈率を表す。横軸におけるGS15及びGS22は、それぞれ、AET-aMD4dY-GS15及びAET-aMD4dY-GS22を表す。Emptyは空ベクターを用いた結果であり、ダイマーペプチドを含む培養上清を用いた場合と同様に活性評価に供した培地に対する希釈率を表す。

[図29]C. glutamicumにおけるダイマーペプチド（HGF-PAS）の分泌発現を示す、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果である。レーン１は、マーカー（XL-Ladder Broad、APRO science）であり、レーン２～５は、pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS22-PAS200を用いたもの、レーン６は、pPK4（空ベクター）を用いたものである。

[図30]LC-MSによるダイマーペプチド（HGF-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図31]HGFとダイマーペプチド（HGF-PAS）の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的受容体活性を表し、横軸は、HGFに関しては濃度を表し、ダイマーペプチド（HGF-PAS）に関しては、活性評価に供した培地に対するダイマーペプチド（HGF-PAS）を含む培養上清の希釈率を表す。横軸におけるPAS22-PAS200は、AET-aMD4dY-PAS22-PAS200を表す。Emptyは空ベクターを用いた結果であり、ダイマーペプチドを含む培養上清を用いた場合と同様に活性評価に供した培地に対する希釈率を表す。

[図32]C. glutamicumにおけるダイマーペプチド（EPO-PAS）の分泌発現を示す、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果である。レーン１は、マーカー（XL-Ladder Broad、APRO science）であり、レーン２～５は、pPK4_CspBss-EPO-PAS8を用いたもの、レーン６～９は、pPK4_CspBss-EPO-PAS22を用いたもの、レーン１０～１３は、pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS8を用いたもの、レーン１４～１７は、pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS22を用いたもの、レーン１８は、pPK4（空ベクター）を用いたものである。

[図33]LC-MSによるダイマーペプチド（EPO-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図34]LC-MSによるダイマーペプチド（EPO-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図35]rhEPOとダイマーペプチド（EPO-PAS）の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的受容体活性を表し、横軸は濃度を表す。

[図36]モノマーペプチドであるEMP35の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的受容体活性を表し、横軸は濃度を表す。

[図37]C. glutamicumにおけるダイマーペプチド（TPO-PAS）の分泌発現を示す、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果である。レーン１は、マーカー（XL-Ladder Broad、APRO science）であり、レーン２～５は、pPK4_CspBss-AET-TPO1-PAS8を用いたもの、レーン６～９は、pPK4_CspBss-TPO2-PAS8を用いたもの、レーン１０～１３は、pPK4_CspBss-AET-TPO2-PAS8を用いたもの、レーン１４は、pPK4（空ベクター）を用いたものである。

[図38]LC-MSによるダイマーペプチド（TPO-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図39]LC-MSによるダイマーペプチド（TPO-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図40]LC-MSによるダイマーペプチド（TPO-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図41]rhTPOとダイマーペプチド（TPO-PAS）のチロシンリン酸化レベルの評価を示すグラフである。上図のとおり検出されたドット発光強度を定量し、その定量結果を下図のグラフにおいて相対的チロシンリン酸化レベルで示している。縦軸は相対的チロシンリン酸化レベルを表し、横軸は、rhTPOに関しては濃度を表し、ダイマーペプチド（TPO-PAS）に関しては、活性評価に供した培地に対するダイマーペプチド（TPO-PAS）を含む培養上清の希釈率を表す。Empty CFBは空ベクターを用いた場合の上清についての結果である。MockはPBS添加群を表す。

[図42]rhTPOとダイマーペプチド（TPO-PAS）の細胞活性化能評価を示すグラフである。上図のとおり検出されたドット発光強度を定量し、その定量結果を下図のグラフにおいて示している。縦軸はドット発光強度を表し、横軸は、rhTPOに関しては濃度を表し、ダイマーペプチド（TPO-PAS）に関しては、活性評価に供した培地に対するダイマーペプチド（TPO-PAS）を含む培養上清の希釈率を表す。MockはPBS添加群を表す。

[図43]Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit (R&D Systems)を用いて、rhTPOとダイマーペプチド（TPO-PAS）のシグナル活性化特性を評価した図である。ダイマーペプチド（TPO-PAS）については、活性評価に供した培地に対するダイマーペプチド（TPO-PAS）を含む培養上清の希釈率が示されている。MockはPBS添加群を表す。

[図44]Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit (R&D Systems)を用いて測定したrhTPOとダイマーペプチド（TPO-PAS）のリン酸化能を定量的に示したグラフである。縦軸は相対的ドット発光強度を表し、横軸は、活性化された分子を表す。ダイマーペプチド（TPO-PAS）については、活性評価に供した培地に対するダイマーペプチド（TPO-PAS）を含む培養上清の希釈率が示されている。MockはPBS添加群を表す。

[図45]C. glutamicumにおけるヘテロダイマーペプチド（VEGFR_D2-PAS）の分泌発現を示す、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果である。レーン１は、マーカー（XL-Ladder Broad、APRO science）であり、レーン２及び３は、それぞれ、pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS16を用いた場合の培養上清についてのもの及び菌体を含む培養液全体についてのもの、レーン４及び５は、それぞれ、pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS16を用いた場合であって、菌体を含む沈殿画分にTris-HClを添加後の上清画分についてのもの及び菌体を含む混合液全体についてのもの、レーン６及び７は、それぞれ、pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS16を用いた場合であって、菌体を含む沈殿画分に尿素処理液（0.5M尿素）を添加後の上清画分についてのもの及び菌体を含む混合液全体についてのもの、レーン８及び９は、それぞれ、pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS16を用いた場合で

あって、菌体を含む沈殿画分に尿素処理液（1.0M尿素）を添加後の上清画分についてのもの及び菌体を含む混合液全体についてのものである。

[図46]LC-MSによるヘテロダイマーペプチド（VEGFR_D2-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図47]ヘテロダイマーペプチド（VEGFR_D2-PAS）とモノマーペプチドであるPm3及びPm4のVEGF阻害能の評価を示すグラフである。縦軸は相対的VEGF活性（相対的受容体活性）を表し、横軸は濃度を表す。

[図48]C. glutamicumにおけるダイマーペプチド（EPO-PAS、EPO-GS）の分泌発現を示す、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果である。レーン１は、マーカー（XL-Ladder Broad、APRO science）であり、レーン２～５は、pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS49を用いたもの、レーン６～９は、pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS49-bを用いたもの、レーン１０～１３は、pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS100を用いたもの、レーン１４～１７は、pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS100-bを用いたもの、レーン１８～２１は、pPK4_CspBss-AET-EPO-GS8を用いたもの、レーン２２～２５は、pPK4_CspBss-AET-EPO-GS22を用いたもの、レーン２６は、pPK4（空ベクター）を用いたものである。

[図49]LC-MSによるダイマーペプチド（EPO-GS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図50]LC-MSによるダイマーペプチド（EPO-GS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図51]LC-MSによるダイマーペプチド（EPO-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図52]LC-MSによるダイマーペプチド（EPO-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図53]LC-MSによるダイマーペプチド（EPO-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図54]LC-MSによるダイマーペプチド（EPO-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図55]ダイマーペプチド（EPO-PAS、EPO-GS）の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的受容体活性を表し、横軸は濃度を表す。

[図56]ダイマーペプチド（EPO-PAS、EPO-GS）の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的受容体活性を表し、横軸は濃度を表す。

[図57]ダイマーペプチド（EPO-PAS）の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的受容体活性を表し、横軸は濃度を表す。

[図58]C. glutamicumにおけるダイマーペプチド（EPO-PAS）の分泌発現を示す、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果である。レーン１は、マーカー（XL-Ladder Broad、APRO science）であり、レーン２～５は、pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS22-PAS200を用いたもの、レーン６～９は、pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS22-PAS600を用いたもの、レーン１０は、pPK4（空ベクター）を用いたものである。

[図59]LC-MSによるダイマーペプチド（EPO-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図60]LC-MSによるダイマーペプチド（EPO-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図61]ダイマーペプチド（EPO-PAS）の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的受容体活性を表し、横軸は濃度を表す。

[図62]MALDI-TOF-MSによるダイマーペプチド（HGF-PAS）の測定結果である。

[図63]MALDI-TOF-MSによるダイマーペプチド（HGF-PAS）の測定結果である。

[図64]MALDI-TOF-MSによるダイマーペプチド（HGF-PAS）の測定結果である。

[図65]MALDI-TOF-MSによるダイマーペプチド（EPO-PAS）の測定結果である。

[図66]MALDI-TOF-MSによるダイマーペプチド（EPO-PAS）の測定結果である。

[図67]MALDI-TOF-MSによるダイマーペプチド（EPO-PAS）の測定結果である。

[図68]MALDI-TOF-MSによるダイマーペプチド（VEGFR_D2-PAS）の測定結果である。

[図69]ダイマーペプチド（HGF-PAS）の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的受容体活性を表し、横軸は、活性評価に供した培地に対するダイマー

ペプチド（HGF-PAS）を含む無細胞発現系の反応液の希釈倍率を表す。Blankは無細胞発現において発現用DNAを用いない場合の結果である。

[図70]ダイマーペプチド（EPO-PAS）の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的受容体活性を表し、横軸は濃度を表す。

[図71]ヘテロダイマーペプチド（VEGFR_D2-PAS）のVEGF阻害能の評価を示すグラフである。縦軸は相対的VEGF活性（相対的受容体活性）を表し、横軸は濃度を表す。

[図72]ヘテロダイマーペプチド（VEGFR_D2-PAS、VEGFR_D2-GS）のVEGF阻害能の評価を示すグラフである。縦軸は相対的VEGF活性（相対的受容体活性）を表し、横軸は濃度を表す。

[図73]C. glutamicumにおけるダイマーペプチド及びトリマーペプチド（HGF-PAS）の分泌発現を示す、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果である。レーン１は、マーカー（XL-Ladder Broad、APRO science）であり、レーン２～５は、pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS22-Trimerを用いたもの、レーン６は、pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS22を用いたもの、レーン７は、pPK4（空ベクター）を用いたものである。

[図74]LC-MSによるトリマーペプチド（HGF-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図75]ダイマーペプチド及びトリマーペプチド（HGF-PAS）の活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的受容体活性を表し、横軸は濃度を表す。

[図76]HGF、ダイマーペプチド（HGF-PAS）、及びモノマーペプチドであるaMD4dYの活性評価を示すグラフである。縦軸は相対的受容体活性を表し、横軸は濃度を表す。

[図77]C. glutamicumにおけるヘテロダイマーペプチド（VEGFR_D2-PAS、VEGFR_D2-GS）の分泌発現を示す、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果である。レーン１は、マーカー（XL-Ladder Broad、APRO science）であり、レーン２～５は、pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS49を用いたもの、レーン６～９は、pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS49-bを用いたもの、レーン１０～１３は、pPK4_CspBs

s-VEGFR_D2-PAS100を用いたもの、レーン１４～１７は、pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS100-bを用いたもの、レーン１８～２１は、pPK4_CspBss-VEGFR_D2-GS16を用いたもの、レーン２２は、pPK4（空ベクター）を用いたものである。

[図78]LC-MSによるヘテロダイマーペプチド（VEGFR_D2-GS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図79]LC-MSによるヘテロダイマーペプチド（VEGFR_D2-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図80]LC-MSによるヘテロダイマーペプチド（VEGFR_D2-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図81]LC-MSによるヘテロダイマーペプチド（VEGFR_D2-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図82]ヘテロダイマーペプチド（VEGFR_D2-PAS、VEGFR_D2-GS）のVEGF阻害能の評価を示すグラフである。縦軸は相対的VEGF活性（相対的受容体活性）を表し、横軸は濃度を表す。

[図83]ヘテロダイマーペプチド（VEGFR_D2-PAS）のVEGF阻害能の評価を示すグラフである。縦軸は相対的VEGF活性（相対的受容体活性）を表し、横軸は濃度を表す。

[図84]C. glutamicumにおけるダイマーペプチド（TPO-PAS、TPO-GS）の分泌発現を示す、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果である。レーン１は、マーカー（XL-Ladder Broad、APRO science）であり、レーン２～５は、pPK4_CspBss-TPO2-PAS49を用いたもの、レーン６～９は、pPK4_CspBss-TPO2-PAS49-bを用いたもの、レーン１０～１３は、pPK4_CspBss-TPO2-PAS100を用いたもの、レーン１４～１７は、pPK4_CspBss-TPO2-PAS100-bを用いたもの、レーン１８～２１は、pPK4_CspBss-TPO2-GS8を用いたもの、レーン２２は、pPK4（空ベクター）を用いたものである。

[図85]LC-MSによるダイマーペプチド（TPO-GS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図86]LC-MSによるダイマーペプチド（TPO-PAS）の測定結果である。Calcは

理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図87]LC-MSによるダイマーペプチド（TPO-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図88]LC-MSによるダイマーペプチド（TPO-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図89]LC-MSによるダイマーペプチド（TPO-PAS）の測定結果である。Calcは理論値を表し、Obsは実測値を表す。

[図90]Phospho-CREB (Ser133) and Total CREB ELISA kit（RayBio社）を用いて測定したrhTPOとダイマーペプチド（TPO-PAS、TPO-GS）のリン酸化能を定量的に示したグラフである。縦軸は相対的CREBリン酸化レベルを表し、横軸は、活性化された分子を表す。MockはPBS添加群を表す。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明の一実施態様は、ペプチド分子に関する。このようなペプチド分子は、

（I）第１の生理活性ペプチド部位と、

（II）４９個以下のアミノ酸残基からなるリンカー部位と、

（III）前記リンカー部位を介して前記第１の生理活性ペプチド部位とは反対側に位置する第２の生理活性ペプチド部位と

を含むペプチド分子であって、

前記第１の生理活性ペプチド部位と前記第２の生理活性ペプチド部位が、互いに同じであっても異なっていてもよく、

前記リンカー部位のアミノ酸配列の少なくとも９０％がアラニン（A）、プロリン（P）及びセリン（S）から選択されるアミノ酸残基からなる、ペプチド分子である。

本発明のペプチド分子の一実施態様において、リンカー部位のＮ末端側に第１の生理活性ペプチド部位を含み、リンカー部位のＣ末端側に第２の生理活性ペプチド部位を含んでもよく、リンカー部位のＣ末端側に第１の生理活性ペプチド部位を含み、リンカー部位のＮ末端側に第２の生理活性ペプチド

部位を含んでもよい。また、本発明のペプチド分子の一実施態様において、第１の生理活性ペプチド部位及び／又は第２の生理活性ペプチド部位のＮ末端側及び／又はＣ末端側、或いはリンカー部位との間において、第１の生理活性ペプチド及び第２の生理活性ペプチドの機能を阻害しない範囲内で任意のアミノ酸配列を含み得る。このような任意のアミノ酸配列としては、例えば、宿主細胞におけるペプチド分子の発現や分泌を高めるのに有用な配列や、単に長さを調節する目的のもの（１個、２個、３個、又は１～５個のＧＩｙ等）を用い得る。

本発明のペプチド分子において、各アミノ酸は、L-アミノ酸であってもD-アミノ酸であってもよく、天然型であっても非天然型であってもよい。また、本発明のペプチド分子において、各アミノ酸は、好ましくはα－、β－またはγ－アミノ酸であり、より好ましくはα－アミノ酸である。

[0011] 本発明のペプチド分子の一実施態様において、ペプチド分子は、Ｎ末端側から「第１の生理活性ペプチド部位」－「リンカー部位」－「第２の生理活性ペプチド部位」－「リンカー部位」－「任意の配列」というように、２以上のリンカー部位を有するよう構成されてもよい。ここで、任意の配列とは、第３の生理活性ペプチド部位であってもよいし（第１の生理活性ペプチド部位及び／又は第２の生理活性ペプチド部位と同じであっても異なっていてもよい）、少なくとも１つのアミノ酸残基からなる付加アミノ酸配列であってもよい。付加アミノ酸配列としては、例えば、分子量10,000以下であり、かつ５０個以下のアミノ酸残基からなる配列が挙げられる。このような付加アミノ酸配列としては、SortaseA識別シグナル、Butelase識別シグナルなどの酵素識別配列、FLAGタグ、PAタグ、ヒスチジンタグ等のタグ配列、リジン、システイン、グルタミン酸、アスパラギン酸等の反応性アミノ酸、又は当該反応性アミノ酸を含む配列等が挙げられる。

本発明のペプチド分子の一実施態様において、ペプチド分子は、リンカー部位（II）が第１のリンカー部位であり、

前記第２の生理活性ペプチド部位の、前記第１のリンカー部位とは反対側

に第２のリンカー部位を更に含み、

前記第２のリンカー部位を介して前記第２の生理活性ペプチド部位とは反対側に位置する第３の生理活性ペプチド部位を更に含み、

前記第３の生理活性ペプチド部位が、前記第１の生理活性ペプチド部位及び／又は前記第２の生理活性ペプチド部位と同じであっても異なっていてもよく、

前記第２のリンカー部位が、４９個以下のアミノ酸残基からなり、そのアミノ酸配列の少なくとも９０％がアラニン（A）、プロリン（P）及びセリン（S）から選択されるアミノ酸残基からなり、前記第１のリンカー部位と同じであっても異なっていてもよい、というものであり得る。

[0012] 本明細書において用いられる用語「生理活性ペプチド」は、ヒトもしくは動物等の生体内において生理活性を示すことができるペプチドを意味する。ここで、「生理活性」とは、生体の生理的機能に対して作用する性質のことであり、生理的機能を亢進する性質及び生理的機能を抑制する性質のどちらも含み得る。

本明細書において、「生理活性ペプチド」には、ヒトもしくは動物等の生体内において生理活性を示すことができるペプチドそれ自体だけでなく、生体内での修飾により生理活性を示すようになるペプチド（即ち、前駆物質）も含まれ、「生理活性ペプチド」は、天然に存在するアミノ酸配列からなるものであってもよく、天然に存在しないアミノ酸配列からなるものであってもよい。「生理活性ペプチド」としては、例えば、標的結合ペプチド、標的阻害ペプチド、標的活性化ペプチド、酵素認識ペプチド等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0013] 本明細書において用いられる用語「標的結合ペプチド」は、受容体、酵素、イオンチャネル、トランスポーター等の標的（主にタンパク質）に結合する生理活性ペプチド（生体内での修飾により標的への結合性又は生理活性を示すようになるものを含む。）を意味する。標的結合ペプチドとしては、例えば、アルブミン結合環状ペプチド、臓器送達環状ペプチド等が挙げられる

が、これらに限定されるものではない。

本明細書において用いられる用語「標的阻害ペプチド」は、受容体、酵素、イオンチャネル、トランスポーター等の標的（主にタンパク質）の活性化により生じる生体反応又は当該標的が関与する生理的機能を阻害する作用を有する生理活性ペプチド（生体内での修飾により阻害作用を示すようになるものを含む。）を意味する。この「標的阻害ペプチド」には、標的自体に結合することで、当該標的の活性化により生じる生体反応又は当該標的が関与する生理的機能を阻害する生理活性ペプチドだけでなく、標的に結合する因子に結合して当該因子の性質又は形状を変化させることに基づき、当該標的の活性化により生じる生体反応又は当該標的が関与する生理的機能を阻害する生理活性ペプチドも含まれる。

本明細書において用いられる用語「標的活性化ペプチド」は、受容体、酵素、イオンチャネル、トランスポーター等の標的（主にタンパク質）を活性化して生体反応を生じさせる作用又は当該標的が関与する生理的機能を亢進する作用を有する生理活性ペプチド（生体内での修飾により活性化作用又は亢進作用を示すようになるものを含む。）を意味する。この「標的活性化ペプチド」には、標的自体に結合することで、当該標的を活性化して生体反応を生じさせる又は当該標的が関与する生理的機能を亢進する生理活性ペプチドだけでなく、ある因子に結合して当該因子の性質又は形状を変化させることで、当該因子が標的に結合するようになることに基づき、当該標的を活性化して生体反応を生じさせる又は当該標的が関与する生理的機能を亢進する生理活性ペプチドも含まれる。

「標的結合ペプチド」、「標的阻害ペプチド」及び「標的活性化ペプチド」における標的としては、好ましくは、二量化により活性化する受容体、例えば、増殖因子受容体、成長因子受容体、サイトカイン受容体等が挙げられる。

本明細書において用いられる用語「酵素認識ペプチド」は、酵素が基質として認識する生理活性ペプチド（生体内での修飾により酵素が基質として認

識するようになるもの又は生理活性を示すようになるものを含む。）を意味する。

[0014] 本発明のペプチド分子の一実施態様において、第１の生理活性ペプチド部位と第２の生理活性ペプチド部位の分子量は、特に限定されないが、例えば、250以上、500以上、800以上、又は1,000以上であり得、10,000以下、9,000以下、8,000以下、7,000以下、6,000以下、5,000以下、4,000以下であり得る。

本発明のペプチド分子の一実施態様において、第１の生理活性ペプチド部位と第２の生理活性ペプチド部位の長さは、特に限定されないが、例えば、それぞれ独立に、３個以上、６個以上、１０個以上、又は１２個以上のアミノ酸残基からなるものであり得、５０個以下、４５個以下、４０個以下、３５個以下、３０個以下、２５個以下、又は２０個以下のアミノ酸残基からなることができる。

本発明のペプチド分子の一実施態様において、第１の生理活性ペプチド部位及び／又は第２の生理活性ペプチド部位は、直鎖であっても分岐鎖であってもよく、環状ペプチドを構成していてもよい。第１の生理活性ペプチド部位及び／又は第２の生理活性ペプチド部位における環状ペプチドは、どのような結合様式で環状構造となっているかは特に限定されないが、例えば２つのシステイン残基間でジスルフィド結合により、チオエーテル結合（チオール基とハロアルキル基との結合）により、1,2,3-トリアゾールの結合（アジド基とアルキン基との結合）により環状構造を形成し得る。なお、ジスルフィド結合は、菌体を培養することにより菌体内もしくは菌体外で自発的に、または菌による酵素反応にて形成されてもよい。

本発明のペプチド分子の一実施態様において、第１の生理活性ペプチド部位は、２つのシステイン残基、又は少なくとも２つのシステイン残基を含み得る。

本発明のペプチド分子の一実施態様において、第２の生理活性ペプチド部位は、２つのシステイン残基、又は少なくとも２つのシステイン残基を含み

得る。

[0015] 本発明のペプチド分子の一実施態様において、好ましくは、第１の生理活性ペプチド部位は環状ペプチドを構成している。

本発明のペプチド分子の一実施態様において、好ましくは、第２の生理活性ペプチド部位は環状ペプチドを構成している。

本発明のペプチド分子が第１の生理活性ペプチド部位及び／又は第２の生理活性ペプチド部位において環状ペプチドを有する場合、環状ペプチドとしては、特に限定されないが、例えば、FGFR結合ペプチド、c-Met（HGFR）結合ペプチド、エリスロポエチン受容体結合ペプチド、トロンボポエチン受容体結合ペプチド、アルブミン結合ペプチド、EGFR結合ペプチド、VEGFR結合ペプチド、PDGFR結合ペプチド、Axl結合ペプチド、PDGFR結合ペプチド、SCFR結合ペプチド、Flt-3結合ペプチド、c-Ret結合ペプチド、ROR結合ペプチド、Tie結合ペプチド、NGFR結合ペプチド、Insulin receptor結合ペプチド、EphR結合ペプチド、Alk結合ペプチド、DDR結合ペプチド、TGFBR結合ペプチド、Activin受容体結合ペプチド、BMP受容体結合ペプチド、インターロイキン受容体結合ペプチド、T細胞受容体結合ペプチド、トランスフェリン受容体結合ペプチド、リポタンパク質受容体結合ペプチド、ユビキチンリガーゼ結合ペプチド、抗体結合ペプチド、補体結合ペプチド、GPCR結合ペプチド、イオンチャネル結合ペプチド、ウイルス結合ペプチド等が挙げられる。

[0016] 本発明のペプチド分子の一実施態様において、具体例としては、第１の生理活性ペプチド部位と前記第２の生理活性ペプチド部位は、それぞれ、c-Met（単にMetとも言う。）タンパク質に結合する環状ペプチドを構成しており、互いに同じであっても異なっていてもよい。c-Metタンパク質に結合する環状ペプチドとしては、以下の（a）～（i）から選択されるアミノ酸配列を含む又はからなる、ジスルフィド結合により環状構造を形成している環状ペプチドが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

（a）CYRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：１）

（b）CRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：２）

(c) CYWYYAWDQTYKAFPC（配列番号：３）

(d) CWYYAWDQTYKAFPC（配列番号：４）

(e) CYISWNEFNSPNWRFITC（配列番号：５）

(f) CISWNEFNSPNWRFITC（配列番号：６）

(g) （a）～（f）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の１又は２個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されており、かつc-Metタンパク質に結合するペプチド。

（h）（a）～（f）のいずれかのアミノ酸配列と90％以上の配列同一性を有し、但し両端のシステイン残基を有しているアミノ酸配列からなり、かつc-Metタンパク質に結合するペプチド。例えば、配列同一性は、92％以上、95％以上、又は98％以上であってもよい。なお、本明細書において、アミノ酸配列相同性は、公知の解析ツールを用いて算出することができ、例えば、全米バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）の相同性アルゴリズムＢＬＡＳＴ（Basic local alignment search tool）を用いることにより算出することができる。また、アミノ酸配列相同性の算出には、解析ツールにおけるデフォルト（初期設定）のパラメータを用いればよい。

（i）（a）～（h）のいずれかのアミノ酸配列において、両端のシステイン残基以外の少なくとも１つのアミノ酸が修飾されているペプチド。ここで、アミノ酸の修飾は、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニリル化、ADPリボシル化又は糖鎖付加である。

なお、MetはHGF受容体で、チロシンキナーゼ型受容体であり、このようなMet（HGFR）に結合する環状ペプチドは、ダイマー化することでMet（HGFR）アゴニストとして機能することが知られている。

[0017] 本明細書において、「置換、欠失又は付加」との表現において、置換とは、公知のアミノ酸への置換を意味し、好ましくは保存的アミノ酸置換である。「保存的アミノ酸置換」は、類似した化学的性質（例えば、電荷又は疎水性）を伴う側鎖Ｒ基を有する別のアミノ酸残基によって、アミノ酸残基が置換された置換である。類似した化学的性質を伴う側鎖を有するアミノ酸基の

例には、脂肪族側鎖を有するグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシン、脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するセリン及びスレオニン、アミド含有側鎖を有するアスパラギン及びグルタミン、芳香族側鎖を有するフェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン、塩基性側鎖を有するリシン、アルギニン、及びヒスチジン、並びに酸性側鎖を有するアスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれる。置換により導入される各アミノ酸は、L-アミノ酸であってもD-アミノ酸であってもよく、天然型アミノ酸であっても非天然型であってもよいが、好ましくは、ヒトや動物においてタンパク質を構成するアミノ酸である。

本明細書において、「置換、欠失又は付加」との表現において、付加とは、公知のアミノ酸がアミノ酸配列の末端に付加されること、又は公知のアミノ酸がアミノ酸配列のアミノ酸残基間に挿入されることを意味する。付加により導入される各アミノ酸は、L-アミノ酸であってもD-アミノ酸であってもよく、天然型アミノ酸であっても非天然型であってもよいが、好ましくは、ヒトや動物においてタンパク質を構成するアミノ酸である。

[0018] 本発明のペプチド分子の一実施態様において、具体例としては、第１の生理活性ペプチド部位と前記第２の生理活性ペプチド部位は、それぞれ、エリスロポエチン受容体に結合する環状ペプチドを構成しており、互いに同じであっても異なっていてもよい。エリスロポエチン受容体に結合する環状ペプチドとしては、以下の（j）～（n）から選択されるアミノ酸配列を含む又はからなる、ジスルフィド結合により環状構造を形成している環状ペプチドが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

（j）GGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：６５）

（k）CISWNEFNSPNWRFITC（配列番号：６６）

（l）（j）又は（k）のアミノ酸配列において、システイン残基以外の１又は２個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されており、かつエリスロポエチン受容体に結合するペプチド。

（m）（j）又は（k）のいずれかのアミノ酸配列と90％以上の配列同一性を有

し、但しシステイン残基を（j）又は（k）におけるそのままの位置で有しているアミノ酸配列からなり、かつエリスロポエチン受容体に結合するペプチド。例えば、配列同一性は、92%以上、95%以上、又は98%以上であってもよい。

（n）（j）～（m）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の少なくとも１つのアミノ酸が修飾されているペプチド。ここで、アミノ酸の修飾は、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニリル化、ADPリボシル化又は糖鎖付加である。

[0019] 本発明のペプチド分子の一実施態様において、具体例としては、第１の生理活性ペプチド部位と前記第２の生理活性ペプチド部位は、それぞれ、トロンボポエチン受容体に結合する生理活性ペプチドからなり、互いに同じであっても異なっていてもよい。トロンボポエチン受容体に結合する生理活性ペプチドとしては、以下の（o）～（u）から選択されるアミノ酸配列を含む又はからなるペプチドが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

（o）IEGPTLRQWLAARA（配列番号：６７）

（p）GGCADGPTLREWISFCGG（配列番号：６８）

（q）GGCTLREWLHGGFCGG（配列番号：６９）

（r）LAIEGPTLRQWLHGNGRDT（配列番号：７０）

（s）（o）～（r）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の１又は２個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されており、かつトロンボポエチン受容体に結合するペプチド。

（t）（o）～（r）のいずれかのアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有し、但し（p）又は（q）を基準とする場合にはシステイン残基を（p）又は（q）におけるそのままの位置で有しているアミノ酸配列からなり、かつトロンボポエチン受容体に結合するペプチド。例えば、配列同一性は、92%以上、95%以上、又は98%以上であってもよい。

（u）（o）～（t）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の少なくとも１つのアミノ酸が修飾されているペプチド。ここで、アミノ酸

の修飾は、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニリル化、ADPリボシル化又は糖鎖付加である。

配列番号：６８と配列番号：６９で示されるペプチドは、それぞれジスルフィド結合により環状構造を形成している環状ペプチドである。

[0020] 本発明のペプチド分子の一実施態様において、具体例としては、第１の生理活性ペプチド部位と前記第２の生理活性ペプチド部位は、それぞれ、血管内皮細胞増殖因子受容体（VEGFR）に結合する環状ペプチドを構成しており、互いに同じであっても異なっていてもよい。VEGFRに結合する環状ペプチドとしては、以下の（aa）～（ff）から選択されるアミノ酸配列を含む又はからなる、ジスルフィド結合により環状構造を形成している環状ペプチドが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

（aa）AGPTWCEDDWYYCWLFGT（配列番号：７１）

（bb）VCWEDSWGGEVCWLFGT（配列番号：７２）

（cc）VCWEDSWGGEVCFRYDP（配列番号：７３）

（dd）（aa）～（cc）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の１又は２個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されており、かつVEGFRに結合するペプチド。

（ee）（aa）～（cc）のいずれかのアミノ酸配列と90％以上の配列同一性を有し、但しシステイン残基を（aa）～（cc）におけるそのままの位置で有しているアミノ酸配列からなり、かつVEGFRに結合するペプチド。例えば、配列同一性は、92％以上、95％以上、又は98％以上であってもよい。

（ff）（aa）～（ee）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の少なくとも１つのアミノ酸が修飾されているペプチド。ここで、アミノ酸の修飾は、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニリル化、ADPリボシル化又は糖鎖付加である。

[0021] 本発明のペプチド分子の一実施態様において、リンカー部位は、分子量10,000以下であり得る。

本発明のペプチド分子の一実施態様において、リンカー部位は、そのアミ

ノ酸配列の少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は１００％がアラニン（A）、プロリン（P）及びセリン（S）から選択されるアミノ酸残基からなり得る。プロリン残基は、リンカー部位のアミノ酸配列において、４％超かつ４０％未満を構成し得る。例えば、プロリン残基は、リンカー部位のアミノ酸配列において、約４％超、約５％超、約６％超、約８％超、約１０％超、約１５％超、又は約２０％超を構成してもよく、約４０％未満、又は約３５％未満を構成してもよい。また、アラニン残基及びセリン残基は、それぞれ独立に、約４％超、約１０％超、又は約２０％超を構成してもよく、約５０％未満を構成してもよい。

本明細書において、用語「約Ｘ％」とは、そのＸという数に制限されるのではなく、さらなる１０％～２０％多い残基の値、又は１０％～２０％少ない残基の値も含む。例えば、用語「約１０％」はまた、それぞれ、１１％又は１２％、及び９％又は８％にも関する。

リンカー部位のアミノ酸配列において、アラニン、セリンおよびプロリンとは異なるアミノ酸残基は、例えば、Ａｒｇ、Ａｓｎ、Ａｓｐ、Ｃｙｓ、Ｇｌｎ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｔｈｒ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ及びＶａｌ、並びにこれらのアミノ酸を修飾してなるものや官能基又は保護基を付加したもの（例えば、クロロアセチル化したアミノ酸、homocysteine、mercaptonorvaline、mercaptonorleucine、2-amino-7-mercaptoheptanoic acid、および2-amino-8-mercaptooctanoic acid、並びにこれらのアミノ酸のSH基をいったん保護しておいた後に保護基を脱保護したアミノ酸、propargylglycine、homopropargylglycine、2-amino-6-heptynoic acid、2-amino-7-octynoic acid、2-amino-8-nonynoic acid、4-pentynoyl化や5-hexynoyl化したアミノ酸、azidoalanine、2-amino-4-azidobutanoic acid、azidoptonorvaline、azidonorleucine、2-amino-7-azidoheptanoic acid、2-amino-8-azidooctanoic acid、azidoacetyl化や3-azidopentanoyl化したアミノ酸、N-(4-aminomethyl-benzoyl)-phenylalanine (AMBF)、4-3-aminomethyltyrosine、5-hydroxytryptophan (WOH)、N-3-chloromethylbenzoy

l-L-phenylalanine、N-3-chloromethylbenzoyl-L-tyrosine、N-3-chloromethylbenzoyl-L-tryptophane）からなる群から選択することができる。また、各アミノ酸は、L-アミノ酸であってもD-アミノ酸であってもよい。このようなアラニン、セリンおよびプロリンとは異なるアミノ酸残基としては、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、ＴｙｒもしくはＴｒｐのような疎水性側鎖を有さないもの、及び／又はＬｙｓ、Ａｒｇ、ＡｓｐもしくはＧｌｕのような荷電を有する側鎖を有さないものが好ましい。

[0022] 本発明のペプチド分子の一実施態様において、リンカー部位は、そのアミノ酸配列の少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は１００％がアラニン（A）及びプロリン（P）から選択されるアミノ酸残基からなり得る。この場合、プロリン残基は、リンカー部位のアミノ酸配列において、１０％超かつ７５％未満を構成し得る。例えば、プロリン残基は、リンカー部位のアミノ酸配列において、約１０％超、約１２％超、約１４％超、約１８％超、約２０％超、約２２％超、約２３％超、約２４％超、又は約２５％超を構成してもよく、約７５％未満、約７０％未満、約６５％未満、約６０％未満、約５５％未満、約５０％未満、約４８％未満、約４６％未満、約４４％未満、約４２％未満、約４１％未満、約４０％未満、約３９％未満、約３８％未満、約３７％未満、約３６％未満、又は約３５％未満を構成してもよい。また、アラニン残基は、約２５％超、約３０％超、約３５％超、約４０％超、約４５％超、約５０％超、約５２％超、約５４％超、約５６％超、約５８％超、約５９％超、約６０％超、約６１％超、約６２％超、約６３％超、約６４％超、又は約６５％超を構成してもよく、約９０％未満、約８８％未満、約８６％未満、約８４％未満、約８２％未満、約８０％未満、約７９％未満、約７８％未満、約７７％未満、約７６％未満、又は約７５％未満を構成してもよい。

リンカー部位のアミノ酸配列において、アラニン、セリンおよびプロリンとは異なるアミノ酸残基は、Ａｒｇ、Ａｓｎ、Ａｓｐ、Ｃｙｓ、Ｇｌｎ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｔｈｒ

、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ及びＶａｌからなる群から選択することができる。このようなアラニン、セリンおよびプロリンとは異なるアミノ酸残基としては、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、ＴｙｒもしくはＴｒｐのような疎水性側鎖を有さないもの、及び／又はＬｙｓ、Ａｒｇ、ＡｓｐもしくはＧｌｕのような荷電を有する側鎖を有さないものが好ましい。

[0023] 本発明のペプチド分子の一実施態様において、リンカー部位は、複数のアミノ酸リピートを含み、前記アミノ酸リピートがアラニン（A）、プロリン（P）及びセリン（S）からなり、前記アミノ酸リピートにおいて同一のアミノ酸残基が連続する数が６残基以下、５残基以下、４残基以下、又は３残基以下であり得る。

本発明のペプチド分子の一実施態様において、リンカー部位は、複数のアミノ酸リピートを含み、前記アミノ酸リピートがアラニン（A）及びプロリン（P）からなり、前記アミノ酸リピートにおいて同一のアミノ酸残基が連続する数が６残基以下、５残基以下、４残基以下、又は３残基以下であり得る。

本発明のペプチド分子の一実施態様において、リンカー部位は、AP、AAP、AS、ASP及びASSからなる群から選択されるアミノ酸配列を２つ以上繰り返して含むものであり得る。

本発明のペプチド分子の一実施態様において、リンカー部位は、例えば、５個以上、６個以上、７個以上、又は８個以上のアミノ酸残基からなることができる。

[0024] 本発明のペプチド分子の一実施態様において、リンカー部位の具体例としては、以下のアミノ酸配列を含むものや、以下のアミノ酸配列からなるものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。AAPAAPAP（配列番号：７４）、AAPAAPAPAAPAAPAP（配列番号：７５）、AAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPA APAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPA（配列番号：７６）、SAPSPSSAPASASAPASPASASASA SPASSPASASSASPAASSASPASS（配列番号：７７）、AAPAAPAPAAPAAPAPAAPA（配列番号：７）、AAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAP（配列番号：８）、AAPAAPAPAAPAAP（配列番号：９）、AAPAAAPAPAAPAAPAPAAP（配列番号１０）、AAAPAAAPAAAPA

AAPAAAP（配列番号１１）、AAPAAPAAPAAPAAPAAPAAP（配列番号１２）、APAAAPAPAAAPAPAAAPAPAAAP（配列番号１３）、AAAPAAPAAPPAAAAPAAPAAPPA（配列番号１４）、及びAPAPAPAPAPAPAPAPAPAP（配列番号１５）、ASPAAPAPASPAAPAPSAPA（配列番号１６）、AAPASPAPAAPSAPAPAAPS（配列番号１７）、APSSPSPSAPSSPSPASPSS（配列番号１８）、SAPSSPSPSAPSSPSPASPS（配列番号１９）、SSPSAPSPSSPASPSPSSPA（配列番号２０）、AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA（配列番号２１）、及びASAAAPAAASAAASAPSAAA（配列番号２２）、並びにこれらの円順列変異配列から選択されるアミノ酸配列。

円順列変異配列は、AAPAAPAPAAPAAPAPAAPA（配列番号：７）を例にして説明すれば、例えば、上記の配列の第１のアラニンを除去すること及び上記の配列の末端に別のアラニンを付加することによって容易に作製され得る。配列番号：７のこのような円順列変異配列は、APAAPAPAAPAAPAPAAPAA（配列番号：２３）となる。さらに、配列番号７の環状にアミノ酸残基の順序を変えられた円順列変異配列の限定されない例として、以下のものが挙げられる。PAAPAPAAPAAPAPAAPAAA（配列番号：２４）、AAPAPAAPAAPAPAAPAAAP（配列番号：２５）、APAPAAPAAPAPAAPAAAPA（配列番号：２６）、PAPAAPAAPAPAAPAAAPAA（配列番号：２７）、APAAPAAPAPAAPAAAPAAP（配列番号：２８）、PAAPAAPAPAAPAAAPAAPA（配列番号：２９）、AAPAAPAPAAPAAAPAAPAP（配列番号：３０）、APAAPAPAAPAAAPAAPAPA（配列番号：３１）、及びPAAPAPAAPAAAPAAPAPAA（配列番号：３２）。

[0025] 本発明のペプチド分子の一実施態様において、ペプチド分子は、リンカー部位と隣接しない位置で機能性修飾部位を更に含み得る。

本明細書において用いられる用語「機能性修飾部位」は、ペプチド分子において生理活性ペプチドの機能とは別に、何らかの機能をペプチド分子に付与する部位を意味し、好ましくはアミノ酸配列からなる。機能性修飾部位としては、例えば、安定化配列、水溶性向上配列、酵素識別配列、タグ配列、標的結合配列等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

安定化配列又は水溶性向上配列の具体例としては、特表２０１３－５３１

４８０（ここに本明細書の一部を構成するものとして当該文献の内容を参照により引用する。）に記載されるような少なくとも５０個のプロリン及びアラニンのアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むランダムコイルポリペプチドや、特表２０１０－５３１１３９（ここに本明細書の一部を構成するものとして当該文献の内容を参照により引用する。）に記載されるようなプロリン、アラニン及びセリンのアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むランダムコイルポリペプチド等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

酵素識別配列の具体例としては、SortaseA識別シグナル、Butelase識別シグナル、Transglutaminase識別シグナル等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

タグ配列の具体例としては、FLAGタグ、PAタグ、ヒスチジンタグ等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

標的結合配列の具体例としては、VHHやscFvといった低分子抗体等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

本発明のペプチド分子の一実施態様において、機能性修飾部位は、例えば、３個以上、６個以上、１０個以上、又は１２個以上のアミノ酸残基からなることができ、１０００個以下、５００個以下、３００個以下、又は１５０個以下のアミノ酸残基からなることができる。

[0026] 本発明の一実施態様は、ペプチド分子の製造方法に関する。本発明の製造方法で製造されるペプチド分子は、

（I）第１の生理活性ペプチド部位、

（II）アミノ酸残基からなるリンカー部位、及び

（III）前記リンカー部位を介して前記第１の生理活性ペプチド部位とは反対側に位置する、第２の生理活性ペプチド部位又は少なくとも１つのアミノ酸残基からなる付加アミノ酸配列

を含むものである。

本発明の製造方法の一実施態様において、ペプチド分子は、例えば、Ｎ末

端側から「第１の生理活性ペプチド部位」－「リンカー部位」－「第２の生理活性ペプチド部位」という構造、又はＮ末端側から「第１の生理活性ペプチド部位」－「リンカー部位」－「付加アミノ酸配列」という構造を有し得るが、これらに限定されるものではない。また、ペプチド分子は、Ｎ末端側から「第１の生理活性ペプチド部位」－「リンカー部位」－「第２の生理活性ペプチド部位」－「リンカー部位」－「任意の配列」というように、２以上のリンカー部位を有するよう（第１の生理活性ペプチド部位、並びに第２の生理活性ペプチド部位及び／又は少なくとも１つのアミノ酸残基からなる付加アミノ酸配列を、２以上のリンカー部位を介して３つ以上タンデムに連結させるよう）構成されてもよい。ここで、任意の配列とは、生理活性ペプチド部位であってもよいし（第１の生理活性ペプチド部位及び／又は第２の生理活性ペプチド部位と同じであってもよい）、少なくとも１つのアミノ酸残基からなる付加アミノ酸配列であってもよい。

このような製造されるペプチド分子の具体例としては、前述の、

（I）第１の生理活性ペプチド部位と、

（II）４９個以下のアミノ酸残基からなるリンカー部位と、

（III）前記リンカー部位を介して前記第１の生理活性ペプチド部位とは反対側に位置する第２の生理活性ペプチド部位と

を含むペプチド分子であって、

前記第１の生理活性ペプチド部位と前記第２の生理活性ペプチド部位が、互いに同じであっても異なっていてもよく、

前記リンカー部位のアミノ酸配列の少なくとも９０％がアラニン（A）、プロリン（P）及びセリン（S）から選択されるアミノ酸残基からなる、ペプチド分子であってもよい。

[0027] 本発明の製造方法で製造されるペプチド分子中、第１の生理活性ペプチド部位と第２の生理活性ペプチド部位は、それぞれ、分子量10,000以下であり得、かつ５０個以下のアミノ酸残基からなってもよく、互いに同じであっても異なっていてもよい。第１の生理活性ペプチド部位及び／又は第２の生理

活性ペプチド部位としては、例えば、FGFR結合ペプチド、c-Met（HGFR）結合ペプチド、エリスロポエチン受容体結合ペプチド、トロンボポエチン受容体結合ペプチド、アルブミン結合ペプチド、EGFR結合ペプチド、VEGFR結合ペプチド、PDGFR結合ペプチド、Axl結合ペプチド、PDGFR結合ペプチド、SCFR結合ペプチド、Flt-3結合ペプチド、c-Ret結合ペプチド、ROR結合ペプチド、Tie結合ペプチド、NGFR結合ペプチド、Insulin receptor結合ペプチド、EphR結合ペプチド、Alk結合ペプチド、DDR結合ペプチド、TGFBR結合ペプチド、Activin受容体結合ペプチド、BMP受容体結合ペプチド、インターロイキン受容体結合ペプチド、T細胞受容体結合ペプチド、トランスフェリン受容体結合ペプチド、リポタンパク質受容体結合ペプチド、ユビキチンリガーゼ結合ペプチド、抗体結合ペプチド、補体結合ペプチド、GPCR結合ペプチド、イオンチャネル結合ペプチド、ウイルス結合ペプチド等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

本発明の製造方法の一実施態様において、第１の生理活性ペプチド部位と第２の生理活性ペプチド部位の分子量は、例えば、9,000以下、8,000以下、7,000以下、6,000以下、5,000以下、4,000以下であり得、また、250以上、500以上、800以上、又は1,000以上であり得る。

本発明の製造方法の一実施態様において、第１の生理活性ペプチド部位と第２の生理活性ペプチド部位の長さは、例えば、それぞれ独立に、４５個以下、４０個以下、３５個以下、３０個以下、２５個以下、又は２０個以下のアミノ酸残基からなることができ、また、３個以上、６個以上、１０個以上、又は１２個以上のアミノ酸残基からなるものであり得る。

[0028] 本発明の製造方法の一実施態様において、第１の生理活性ペプチド部位及び／又は第２の生理活性ペプチド部位は、直鎖であっても分岐鎖であってもよく、環状ペプチドを構成していてもよい。第１の生理活性ペプチド部位及び／又は第２の生理活性ペプチド部位における環状ペプチドは、どのような結合様式で環状構造となっているかは特に限定されないが、例えば２つのシステイン残基間でジスルフィド結合により、チオエーテル結合（チオール基

とハロアルキル基との結合）により、1,2,3-トリアゾールの結合（アジド基とアルキン基との結合）により環状構造を形成し得る。なお、ジスルフィド結合は、菌体を培養することにより菌体内もしくは菌体外で自発的に、または菌による酵素反応にて形成されてもよい。

本発明の製造方法の一実施態様において、第１の生理活性ペプチド部位は、２つのシステイン残基、又は少なくとも２つのシステイン残基を含み得る。

本発明の製造方法の一実施態様において、第２の生理活性ペプチド部位は、２つのシステイン残基、又は少なくとも２つのシステイン残基を含み得る。

環状ペプチドとしては、種々のものが存在すると考えられるが、第１の生理活性ペプチド部位及び／又は第２の生理活性ペプチド部位において、どのような環状ペプチドを構成するかは特に限定されない。

本発明の製造方法の一実施態様において、ペプチド分子がダイマーペプチドである場合、モノマーペプチドと比べて高い生理活性を有するものがあり得る。例えば、本発明の製造方法で製造されるペプチド分子が２つのFGFR結合環状ペプチドをリンカー部位を介して結合させたものである場合、１つのFGFR結合環状ペプチドに比べて高いFGFR阻害活性を有し得る。

[0029] 環状ペプチドの具体例として、c-Met（単にMetとも言う。）に結合する環状ペプチドを以下に挙げるが、本発明の製造方法により得られるペプチド分子において環状ペプチドはこれに限定されるものではない。

以下の（a）～（i）から選択されるアミノ酸配列を含む又はからなる、ジスルフィド結合により環状構造を形成している環状ペプチド。

(a) CYRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：１）

(b) CRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：２）

(c) CYWYYAWDQTYKAFPC（配列番号：３）

(d) CWYYAWDQTYKAFPC（配列番号：４）

(e) CYISWNEFNSPNWRFITC（配列番号：５）

（f）CISWNEFNSPNWRFITC（配列番号：６）

（g）（a）～（f）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の１又は２個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されており、かつc-Metタンパク質に結合するペプチド。

（h）（a）～（f）のいずれかのアミノ酸配列と90％以上の配列同一性を有し、但し両端のシステイン残基を有しているアミノ酸配列からなり、かつc-Metタンパク質に結合するペプチド。例えば、配列同一性は、92％以上、95％以上、又は98％以上であってもよい。本明細書において、アミノ酸配列相同性は、公知の解析ツールを用いて算出することができ、例えば、全米バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）の相同性アルゴリズムＢＬＡＳＴ（Basic local alignment search tool）を用いることにより算出することができる。また、アミノ酸配列相同性の算出には、解析ツールにおけるデフォルト（初期設定）のパラメータを用いればよい。

（i）（a）～（h）のいずれかのアミノ酸配列において、両端のシステイン残基以外の少なくとも１つのアミノ酸が修飾されているペプチド。ここで、アミノ酸の修飾は、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニリル化、ADPリボシル化又は糖鎖付加である。

なお、MetはHGF受容体で、チロシンキナーゼ型受容体であり、このようなMet（HGFR）に結合する環状ペプチドは、ダイマー化することでMet（HGFR）アゴニストとして機能することが知られている。

[0030] 本発明の製造方法の一実施態様において、製造されるペプチド分子が有する第１の生理活性ペプチド部位及び／又は第２の生理活性ペプチド部位は、エリスロポエチン受容体に結合する環状ペプチドを構成し得る。第１の生理活性ペプチド部位及び第２の生理活性ペプチド部位の両方がエリスロポエチン受容体に結合する環状ペプチドを構成する場合、それらの環状ペプチドは互いに同じであっても異なっていてもよい。エリスロポエチン受容体に結合する環状ペプチドとしては、以下の（j）～（n）から選択されるアミノ酸配列を含む又はからなる、ジスルフィド結合により環状構造を形成している環

状ペプチドが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

（j）GGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：６５）

（k）CISWNEFNSPNWRFITC（配列番号：６６）

（l）（j）又は（k）のアミノ酸配列において、システイン残基以外の１又は２個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されており、かつエリスロポエチン受容体に結合するペプチド。

（m）（j）又は（k）のいずれかのアミノ酸配列と90％以上の配列同一性を有し、但しシステイン残基を（j）又は（k）におけるそのままの位置で有しているアミノ酸配列からなり、かつエリスロポエチン受容体に結合するペプチド。例えば、配列同一性は、92％以上、95％以上、又は98％以上であってもよい。

（n）（j）～（m）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の少なくとも１つのアミノ酸が修飾されているペプチド。ここで、アミノ酸の修飾は、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニリル化、ADPリボシル化又は糖鎖付加である。

[0031] 本発明の製造方法の一実施態様において、製造されるペプチド分子が有する第１の生理活性ペプチド部位及び／又は第２の生理活性ペプチド部位は、トロンボポエチン受容体に結合する生理活性ペプチドからなり得る。第１の生理活性ペプチド部位及び第２の生理活性ペプチド部位の両方がトロンボポエチン受容体に結合する生理活性ペプチドからなる場合、それらの生理活性ペプチドは互いに同じであっても異なっていてもよい。トロンボポエチン受容体に結合する生理活性ペプチドとしては、以下の（o）～（u）から選択されるアミノ酸配列を含む又はからなるペプチドが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

（o）IEGPTLRQWLAARA（配列番号：６７）

（p）GGCADGPTLREWISFCGG（配列番号：６８）

（q）GGCTLREWLHGGFCGG（配列番号：６９）

（r）LAIEGPTLRQWLHGNGRDT（配列番号：７０）

（s）（o）～（r）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の１又は２個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されており、かつトロンボポエチン受容体に結合するペプチド。

（t）（o）～（r）のいずれかのアミノ酸配列と90％以上の配列同一性を有し、但し（p）又は（q）を基準とする場合にはシステイン残基を（p）又は（q）におけるそのままの位置で有しているアミノ酸配列からなり、かつトロンボポエチン受容体に結合するペプチド。例えば、配列同一性は、92％以上、95％以上、又は98％以上であってもよい。

（u）（o）～（t）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の少なくとも１つのアミノ酸が修飾されているペプチド。ここで、アミノ酸の修飾は、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニリル化、ADPリボシル化又は糖鎖付加である。

配列番号：６８と配列番号：６９で示されるペプチドは、それぞれジスルフィド結合により環状構造を形成している環状ペプチドである。

[0032] 本発明の製造方法の一実施態様において、製造されるペプチド分子が有する第１の生理活性ペプチド部位及び／又は第２の生理活性ペプチド部位は、血管内皮細胞増殖因子受容体（VEGFR）に結合する環状ペプチドを構成し得る。第１の生理活性ペプチド部位及び第２の生理活性ペプチド部位の両方がVEGFRに結合する環状ペプチドを構成する場合、それらの環状ペプチドは互いに同じであっても異なっていてもよい。VEGFRに結合する環状ペプチドとしては、以下の（aa）～（ff）から選択されるアミノ酸配列を含む又はからなる、ジスルフィド結合により環状構造を形成している環状ペプチドが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

（aa）AGPTWCEDDWYYCWLFGT（配列番号：７１）

（bb）VCWEDSWGGEVCWLFGT（配列番号：７２）

（cc）VCWEDSWGGEVCFRYDP（配列番号：７３）

（dd）（aa）～（cc）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の１又は２個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されており、かつVEG

FRに結合するペプチド。

（ee）（aa）～（cc）のいずれかのアミノ酸配列と90％以上の配列同一性を有し、但しシステイン残基を（aa）～（cc）におけるそのままの位置で有しているアミノ酸配列からなり、かつVEGFRに結合するペプチド。例えば、配列同一性は、92％以上、95％以上、又は98％以上であってもよい。

（ff）（aa）～（ee）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の少なくとも１つのアミノ酸が修飾されているペプチド。ここで、アミノ酸の修飾は、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニリル化、ADPリボシル化又は糖鎖付加である。

[0033] 本発明の製造方法の一実施態様において、リンカー部位は、分子量10,000以下であり、かつ５０個以下のアミノ酸残基からなり得る。

また、本発明の製造方法の一実施態様において、リンカー部位は、分子量10,000以下であり、かつ５０個以下又は４９個以下のアミノ酸残基からなるリンカー部位であり得て、そのアミノ酸配列の少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は１００％がアラニン（A）、プロリン（P）及びセリン（S）から選択されるアミノ酸残基からなり得る。この場合、プロリン残基は、リンカー部位のアミノ酸配列において、４％超かつ４０％未満を構成し得る。例えば、プロリン残基は、リンカー部位のアミノ酸配列において、約４％超、約５％超、約６％超、約８％超、約１０％超、約１５％超、又は約２０％超を構成してもよく、約４０％未満、又は約３５％未満を構成してもよい。また、アラニン残基及びセリン残基は、それぞれ独立に、約４％超、約１０％超、又は約２０％超を構成してもよく、約５０％未満を構成してもよい。

本明細書において、用語「約Ｘ％」とは、パーセンテージの簡潔な数に制限されるのではなく、さらなる１０％～２０％多い残基の値、又は１０％～２０％少ない残基の値も含む。例えば、用語「約１０％」は。また、それぞれ、１１％又は１２％、及び９％又は８％にも関する。

リンカー部位のアミノ酸配列において、アラニン、セリンおよびプロリンとは異なるアミノ酸残基は、Ａｒｇ、Ａｓｎ、Ａｓｐ、Ｃｙｓ、Ｇｌｎ、Ｇ

ｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｔｈｒ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ及びＶａｌからなる群から選択することができる。このようなアラニン、セリンおよびプロリンとは異なるアミノ酸残基としては、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、ＴｙｒもしくはＴｒｐのような疎水性側鎖を有さないもの、及び／又はＬｙｓ、Ａｒｇ、ＡｓｐもしくはＧｌｕのような荷電を有する側鎖を有さないものが好ましい。

[0034] 本発明の製造方法の一実施態様において、リンカー部位は、分子量10,000以下であり、かつ５０個以下又は４９個以下のアミノ酸残基からなるリンカー部位であり得て、そのアミノ酸配列の少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は１００％がアラニン（A）及びプロリン（P）から選択されるアミノ酸残基からなり得る。この場合、プロリン残基は、リンカー部位のアミノ酸配列において、１０％超かつ７５％未満を構成し得る。例えば、プロリン残基は、リンカー部位のアミノ酸配列において、約１０％超、約１２％超、約１４％超、約１８％超、約２０％超、約２２％超、約２３％超、約２４％超、又は約２５％超を構成してもよく、約７５％未満、約７０％未満、約６５％未満、約６０％未満、約５５％未満、約５０％未満、約４８％未満、約４６％未満、約４４％未満、約４２％未満、約４１％未満、約４０％未満、約３９％未満、約３８％未満、約３７％未満、約３６％未満、又は約３５％未満を構成してもよい。また、アラニン残基は、約２５％超、約３０％超、約３５％超、約４０％超、約４５％超、約５０％超、約５２％超、約５４％超、約５６％超、約５８％超、約５９％超、約６０％超、約６１％超、約６２％超、約６３％超、約６４％超、又は約６５％超を構成してもよく、約９０％未満、約８８％未満、約８６％未満、約８４％未満、約８２％未満、約８０％未満、約７９％未満、約７８％未満、約７７％未満、約７６％未満、又は約７５％未満を構成してもよい。

リンカー部位のアミノ酸配列において、アラニン、セリンおよびプロリンとは異なるアミノ酸残基は、Ａｒｇ、Ａｓｎ、Ａｓｐ、Ｃｙｓ、Ｇｌｎ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｔｈｒ

、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ及びＶａｌからなる群から選択することができる。このようなアラニン、セリンおよびプロリンとは異なるアミノ酸残基としては、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、ＴｙｒもしくはＴｒｐのような疎水性側鎖を有さないもの、及び／又はＬｙｓ、Ａｒｇ、ＡｓｐもしくはＧｌｕのような荷電を有する側鎖を有さないものが好ましい。

[0035] 本発明の製造方法の一実施態様において、リンカー部位は、複数のアミノ酸リピートを含み、前記アミノ酸リピートがアラニン（A）、プロリン（P）及びセリン（S）からなり、前記アミノ酸リピートにおいて同一のアミノ酸残基が連続する数が６残基以下、５残基以下、４残基以下、又は３残基以下であり得る。

本発明の製造方法の一実施態様において、リンカー部位は、複数のアミノ酸リピートを含み、前記アミノ酸リピートがアラニン（A）及びプロリン（P）からなり、前記アミノ酸リピートにおいて同一のアミノ酸残基が連続する数が６残基以下、５残基以下、４残基以下、又は３残基以下であり得る。

本発明の製造方法の一実施態様において、リンカー部位は、AP、AAP、AS、ASP及びASSからなる群から選択されるアミノ酸配列を２つ以上繰り返して含むものであり得る。

本発明の製造方法の一実施態様において、リンカー部位は、グリシン（G）とセリン（S）から構成される配列を含むものであり得る。この場合、リンカー部位は、GGGGS、GGGS、GGS、及びGSからなる群から選択されるアミノ酸配列を繰り返し含み得る。

本発明の製造方法の一実施態様において、リンカー部位は、グリシンを連続して含むものであり得、また、グリシンのみからなるものであり得る。

本発明の製造方法の一実施態様において、リンカー部位は、EAAAKで示されるアミノ酸配列を繰り返し含み得る。

本発明の製造方法の一実施態様において、リンカー部位のアミノ酸配列としては、A、P及びSからなるもの、A及びPからなるもの、又はGGGGSで示される配列の繰り返しからなるものが好ましいが、これらに限定されるものでは

ない。

本発明の製造方法の一実施態様において、リンカー部位の長さは、５０個以下のアミノ酸残基からなり得るが、例えば、リンカー部位は、４９個以下、４０個以下、３５個以下、３０個以下、又は２５個以下のアミノ酸残基からなることができる。

本発明の製造方法の一実施態様において、リンカー部位は、１個以上のアミノ酸残基からなり得るが、例えば、リンカー部位は、４個以上、８個以上、１２個以上、又は１６個以上のアミノ酸残基からなることができる。

[0036] 本発明の製造方法の一実施態様において、リンカー部位の具体例としては、以下のアミノ酸配列を含むものや、以下のアミノ酸配列からなるものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。AAPAAPAP（配列番号：７４）、AAPAAPAPAAPAAPAP（配列番号：７５）、AAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAPAAPAAPAPA（配列番号：７６）、SAPSPSSAPASASAPASPASASASASPASPSSAPASASAPASPASASASASPASSPASASSASPAASSASPASSSASPSAPAAPSASAAPSASPASSSPAPASAPSPAAAASSPSPAPSSASSAA（配列番号：７９）、AAPAAPAP（配列番号：８０）、AAPAAPAPAAPAAPAPAAPA（配列番号：７）、AAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAP（配列番号：８）、AAPAAPAPAAPAAP（配列番号：９）、AAPAAAPAPAAPAPAAPAAP（配列番号１０）、AAAPAAAPAAAPAAAPAAAP（配列番号１１）、AAPAAPAAPAAPAAPAAPAAP（配列番号１２）、APAAAPAPAAAPAPAAAPAPAAAP（配列番号１３）、AAAPAAPAAPPAAAAPAAPAAPPA（配列番号１４）、及びAPAPAPAPAPAPAPAPAP（配列番号１５）、ASPAAPAPASPAAPAPSAPA（配列番号１６）、AAPASPAPAAPSAPAPAAPS（配列番号１７）、APSSPSPSAPSSPSPASPSS（配列番号１８）、SAPSSPSPSAPSSPSPASPS（配列番号１９）、SSPSAPSPSSPASPSPSSPA（配列

番号２０）、AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA（配列番号２１）、及びASAAAPAAASAAASAPSAAA（配列番号２２）、並びにこれらの円順列変異配列から選択されるアミノ酸配列。

円順列変異配列は、AAPAAPAPAAPAAPAPAAPA（配列番号：７）を例にして説明すれば、例えば、上記の配列の第１のアラニンを除去すること及び上記の配列の末端に別のアラニンを付加することによって容易に作製され得る。配列番号：７のこのような円順列変異配列は、APAAPAPAAPAAPAPAAPAA（配列番号：２３）となる。さらに、配列番号７の環状にアミノ酸残基の順序を変えられた円順列変異配列の限定されない例として、以下のものが挙げられる。PAAPAPAAPAAPAPAAPAAA（配列番号：２４）、AAPAPAAPAAPAPAAPAAAP（配列番号：２５）、APAPAAPAAPAPAAPAAAPA（配列番号：２６）、PAPAAPAAPAPAAPAAAPAA（配列番号：２７）、APAAPAAPAPAAPAAAPAAP（配列番号：２８）、PAAPAAPAPAAPAAAPAAPA（配列番号：２９）、AAPAAPAPAAPAAAPAAPAP（配列番号：３０）、APAAPAPAAPAAAPAAPAPA（配列番号：３１）、及びPAAPAPAAPAAAPAAPAPAA（配列番号：３２）。

[0037] 本発明の製造方法の一実施態様において、本発明の製造方法で製造されるペプチド分子は、第１の生理活性ペプチド部位に対して、リンカー部位を介して反対側に少なくとも１つのアミノ酸残基からなる付加アミノ酸配列を含み得る。この付加アミノ酸配列は、分子量10,000以下であり、かつ５０個以下のアミノ酸残基からなる。このような付加アミノ酸配列としては、SortaseA識別シグナル、Butelase識別シグナルなどの酵素識別配列、FLAGタグ、PAタグ、ヒスチジンタグ等のタグ配列、リジン、システイン、グルタミン酸、アスパラギン酸等の反応性アミノ酸、又は当該反応性アミノ酸を含む配列等が挙げられる。

本発明の製造方法で製造されるペプチド分子が、第１の生理活性ペプチド部位に対して、リンカー部位を介して反対側に少なくとも１つのアミノ酸残基からなる付加アミノ酸配列を含み、前記付加アミノ酸配列が、反応性アミノ酸からなる又は反応性アミノ酸を含む配列である場合、当該ペプチド分子

は、生理活性ペプチド－薬物コンジュゲート等を作成するためのコンジュゲート用試薬として使用し得る。

本発明の製造方法で製造されるペプチド分子は、リンカー部位を介して第１の生理活性ペプチド部位とは反対側に、第２の生理活性ペプチド部位と、少なくとも１つのアミノ酸残基からなる付加アミノ酸配列とを含んでもよい。

本発明の製造方法で製造されるペプチド分子は、リンカー部位のＮ末端側に第１の生理活性ペプチド部位を含み、リンカー部位のＣ末端側に第２の生理活性ペプチド部位及び／又は付加アミノ酸配列を含んでもよい。また、本発明の製造方法で製造されるペプチド分子は、リンカー部位のＣ末端側に第１の生理活性ペプチド部位を含み、リンカー部位のＮ末端側に第２の生理活性ペプチド部位及び／又は付加アミノ酸配列を含んでもよい。更に、本発明の製造方法で製造されるペプチド分子は、第１の生理活性ペプチド部位及び／又は第２の生理活性ペプチド部位のＮ末端側及び／又はＣ末端側、或いはリンカー部位との間において、第１の生理活性ペプチド及び第２の生理活性ペプチドの機能を阻害しない範囲内で任意のアミノ酸配列を含み得る。このような任意のアミノ酸配列としては、例えば、宿主細胞におけるペプチド分子の発現や分泌を高めるのに有用な配列を用い得る。

本発明の製造方法の一実施態様において、製造されるペプチド分子は、リンカー部位と隣接しない位置で機能性修飾部位を更に含み得る。機能性修飾部位については前述のとおりである。

[0038] 本発明の製造方法は、ペプチド分子をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞において前記ポリヌクレオチドを発現させること、又は前記ペプチド分子をコードするポリヌクレオチドを無細胞発現系において発現させることにより、前記ペプチド分子を生成する工程を含む。ペプチド分子をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞は、周知の手法で準備することができる。例えば、ペプチド分子をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞は、当該ポリヌクレオチドを含む組換えベクターを宿主細胞に導入するなどし

て準備されたものであり得る。

本発明の製造方法の一実施態様において、宿主細胞は、特に限定されないが、例えば、エシェリキア属（例えば、Escherichia coli（大腸菌））やコリネバクテリウム属（例えば、Corynebacterium glutamicum）等の原核細胞（細菌）、酵母等の真菌細胞（真菌）、植物細胞、昆虫細胞、及び動物細胞等が挙げられる。宿主細胞としてのコリネバクテリウム属の細菌については、WO2016/171224に記載のものを用いることができる。

本発明の製造方法の一実施態様において、宿主細胞におけるポリヌクレオチドの発現は、一過性であっても安定的であってもよい。宿主細胞の培養条件は、用いる宿主細胞の種類に応じて、技術常識に基づき当業者が適宜選択することができる。例えば、培養を行う環境の温度、湿度及び二酸化炭素濃度等の条件は、宿主細胞においてポリヌクレオチド発現を可能とする条件であればよく、用いる培養培地は、それぞれの宿主細胞に適したものであれば特に限定されず、従来公知のものから選択し得る。

[0039] 本発明の製造方法の一実施態様において、無細胞発現系でのペプチド分子の合成は、細胞の抽出液を用いてもよいし、市販の無細胞発現用試薬を用いてもよく、当業者に周知の技術に基づき行い得る。無細胞発現系に含まれる成分としては、テンプレートである所望のポリペプチドをコードする核酸（DNA又はmRNA）、転写・翻訳・エネルギー再生・翻訳後修飾に必要なタンパク質（RNAポリメラーゼ、リボソーム、アミノアシルtRNA合成酵素、翻訳開始因子、翻訳伸長慎重因子、翻訳終結因子、リボソーム再生因子、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ、アデノシンキナーゼ、クレアチンキナーゼ、プロリルイソメラーゼ、ジスルフィド結合イソメラーゼ、シャペロンなど）、tRNA、アミノアシルtRNA、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、NTP、バッファー等が挙げられる。

市販の無細胞発現用試薬としては、例えば、PUREfrex2.0（ジーンフロンティア社）、PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit (New England BioLabs社）等が挙げられる。

[0040] 本発明の製造方法は、ペプチド分子を生成するにあたって、ペプチド分子をコードするポリヌクレオチド、又は前記ポリヌクレオチドを含む組換えベクターを宿主細胞に導入する工程と、その宿主細胞において前記ポリヌクレオチドを発現させ、ペプチド分子を生成する工程を含んでもよい。当該導入工程における導入手段は、用いる宿主細胞の種類に応じて、技術常識に基づき当業者が適宜選択することができる。使用し得るベクターとしては、ペプチド分子をコードするポリヌクレオチドを機能的に挿入することができ、宿主細胞内で異種核酸断片の複製及び／又は発現をもたらすよう当該断片を宿主細胞内に運搬することができるものであればよく、例えば、プラスミド、ファージ、コスミド及びウイルスが挙げられる。ベクターは、用いる宿主細胞の種類に応じて当業者が適宜選択することができる。

[0041] 本発明の製造方法の一実施態様において、ペプチド分子をコードするポリヌクレオチドは、そのペプチド分子のアミノ酸配列に基づき、従来のポリヌクレオチド合成技術を用いて当業者が適宜合成し得る。ペプチド分子をコードするポリヌクレオチドの例としては、「第１の生理活性ペプチド部位」－「リンカー部位」－「第２の生理活性ペプチド部位」、又は「第１の生理活性ペプチド部位」－「リンカー部位」－「付加アミノ酸配列」の構造を有するペプチド分子をコードするものが挙げられる。このようなポリヌクレオチドから簡便かつ安価にペプチド分子を生成することができる。

本発明の製造方法の一実施態様において、ペプチド分子をコードするポリヌクレオチドは、そのＮ末端側にプロモーター配列やシグナル配列を適宜含んでもよい。また、ポリヌクレオチドは、制限酵素認識配列をＮ末端側及び／又はＣ末端側に含んでもよい。このようなプロモーター配列、シグナル配列、及び制限酵素認識配列は、使用する宿主細胞やベクターの種類に応じて当業者が適宜選択することができる。

本発明の製造方法の一実施態様において、製造されたペプチド分子は、当業者の技術常識に基づき、宿主細胞中から適宜単離することができ、また、精製及び／又は回収することができる。

本発明の製造方法の一実施態様において、製造されたペプチド分子は、宿主細胞から分泌された後、当業者の技術常識に基づき、適宜単離することができ、また、精製及び／又は回収することができる。

[0042] 本発明の製造方法の一実施態様において、ダイマーペプチド等の所望のペプチド分子を１本のポリヌクレオチド鎖から発現することができ、従来の化学合成手法と比較して、ダイマーペプチド等の所望のペプチド分子を簡便かつ安価に製造することができる。

本発明の製造方法の一実施態様において、第１の生理活性ペプチド部位及び／又は第２の生理活性ペプチド部位が環状ペプチドを構成するものである場合、１本のポリヌクレオチド鎖から直鎖のペプチド分子が生成され、宿主細胞内で又は宿主細胞から分泌後に、直鎖のペプチド分子から環状ペプチドを構成させることが可能である。そのため、環状ペプチドを含むペプチド分子の合成に関し、従来の化学合成手法では多数の工程を経る必要があり煩雑であったが、本発明の製造方法によれば環状ペプチドを含むペプチド分子を簡便かつ安価に製造することができる。環状ペプチドの構成に関しては、２つのシステイン残基間でジスルフィド結合により環状構造を形成することができるが、これに限定されるものではない。

[0043] 本発明の一実施態様は、ペプチド分子をコードするためのポリヌクレオチドに関する。このポリヌクレオチドの発現により生成されるペプチド分子は、（I）第１の生理活性ペプチド部位と、（II）アミノ酸残基からなるリンカー部位と、（III）前記リンカー部位を介して前記第１の生理活性ペプチド部位とは反対側に位置する、第２の生理活性ペプチド部位及び／又は少なくとも１つのアミノ酸残基からなる付加アミノ酸配列とを含み得る。ここで、第１の生理活性ペプチド部位と第２の生理活性ペプチド部位は、互いに同じであっても異なっていてもよい。このようなポリヌクレオチドは、生成されるペプチド分子のアミノ酸配列に基づき、従来のポリヌクレオチド合成技術を用いて当業者が適宜合成し得る。

本発明のポリヌクレオチドの一実施態様は、上述した本発明の製造方法に

おいて記載したものと同様であり得る。

本発明のポリヌクレオチドの一実施態様において、当該ポリヌクレオチドは、上述した本発明の製造方法において用いるためのものであり得る。

本発明のポリヌクレオチドの一実施態様において、ポリヌクレオチドの発現により生成されるペプチド分子における第１の生理活性ペプチド部位、アミノ酸残基からなるリンカー部位、第２の生理活性ペプチド部位、及び少なくとも１つのアミノ酸残基からなる付加アミノ酸配列は、上述した本発明の製造方法において記載したものと同様であり得る。

[0044] 本発明の一実施態様は、前記のペプチド分子のみならず、以下のようなペプチド分子にも関する。このペプチド分子は、（I）第１の生理活性ペプチド部位と、（II）アミノ酸残基からなるリンカー部位と、（III）前記リンカー部位を介して前記第１の生理活性ペプチド部位とは反対側に位置する第２の生理活性ペプチド部位とを含み得る。

本発明のペプチド分子の一実施態様において、リンカー部位のＮ末端側に第１の生理活性ペプチド部位を含み、リンカー部位のＣ末端側に第２の生理活性ペプチド部位を含んでもよく、リンカー部位のＣ末端側に第１の生理活性ペプチド部位を含み、リンカー部位のＮ末端側に第２の生理活性ペプチド部位を含んでもよい。また、本発明のペプチド分子の一実施態様において、第１の生理活性ペプチド部位及び／又は第２の生理活性ペプチド部位のＮ末端側及び／又はＣ末端側、或いはリンカー部位との間において、第１の生理活性ペプチド及び第２の生理活性ペプチドの機能を阻害しない範囲内で任意のアミノ酸配列を含み得る。このような任意のアミノ酸配列としては、例えば、宿主細胞におけるペプチド分子の発現や分泌を高めるのに有用な配列を用い得る。

本発明のペプチド分子の一実施態様において、第１の生理活性ペプチド部位と第２の生理活性ペプチド部位は、それぞれ、c-Metタンパク質に結合する環状ペプチドを構成しており、互いに同じであっても異なっていてもよい。このようなc-Met（単にMetとも言う。）タンパク質に結合する環状ペプチド

としては、以下の（a）～（i）から選択されるアミノ酸配列を含む、ジスルフィド結合により環状構造を形成している環状ペプチドが挙げられる。

[0045] （a）CYRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：１）

（b）CRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：２）

（c）CYWYYAWDQTYKAFPC（配列番号：３）

（d）CWYYAWDQTYKAFPC（配列番号：４）

（e）CYISWNEFNSPNWRFITC（配列番号：５）

（f）CISWNEFNSPNWRFITC（配列番号：６）

（g）（a）～（f）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の１又は２個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されており、かつc-Metタンパク質に結合するペプチド。

（h）（a）～（f）のいずれかのアミノ酸配列と90％以上の配列同一性を有し、但し両端のシステイン残基を有しているアミノ酸配列からなり、かつc-Metタンパク質に結合するペプチド。例えば、配列同一性は、92％以上、95％以上、又は98％以上であってもよい。本明細書において、アミノ酸配列相同性は、公知の解析ツールを用いて算出することができ、例えば、全米バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）の相同性アルゴリズムＢＬＡＳＴ（Basic local alignment search tool）を用いることにより算出することができる。また、アミノ酸配列相同性の算出には、解析ツールにおけるデフォルト（初期設定）のパラメータを用いればよい。

（i）（a）～（h）のいずれかのアミノ酸配列において、両端のシステイン残基以外の少なくとも１つのアミノ酸が修飾されているペプチド。ここで、アミノ酸の修飾は、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニリル化、ADPリボシル化又は糖鎖付加である。

なお、このようなMet（HGFR）に結合する環状ペプチドは、ダイマー化することでMet（HGFR）アゴニストとして機能することが知られている。

[0046] 本発明のペプチド分子の一実施態様において、リンカー部位は、分子量10,000以下であり、かつ５０個以下のアミノ酸残基からなり得る。

また、本発明のペプチド分子の一実施態様において、リンカー部位は、分子量10,000以下であり、かつ５０個以下又は４９個以下のアミノ酸残基からなるリンカー部位であり得て、そのアミノ酸配列の少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は１００％がアラニン（A）、プロリン（P）及びセリン（S）から選択されるアミノ酸残基からなり得る。この場合、プロリン残基は、リンカー部位のアミノ酸配列において、４％超かつ４０％未満を構成し得る。例えば、プロリン残基は、リンカー部位のアミノ酸配列において、約４％超、約５％超、約６％超、約８％超、約１０％超、約１５％超、又は約２０％超を構成してもよく、約４０％未満、又は約３５％未満を構成してもよい。また、アラニン残基及びセリン残基は、それぞれ独立に、約４％超、約１０％超、又は約２０％超を構成してもよく、約５０％未満を構成してもよい。

リンカー部位のアミノ酸配列において、アラニン、セリンおよびプロリンとは異なるアミノ酸残基は、Ａｒｇ、Ａｓｎ、Ａｓｐ、Ｃｙｓ、Ｇｌｎ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｔｈｒ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ及びＶａｌからなる群から選択することができる。このようなアラニン、セリンおよびプロリンとは異なるアミノ酸残基としては、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、ＴｙｒもしくはＴｒｐのような疎水性側鎖を有さないもの、及び／又はＬｙｓ、Ａｒｇ、ＡｓｐもしくはＧｌｕのような荷電を有する側鎖を有さないものが好ましい。

[0047] 本発明のペプチド分子の一実施態様において、リンカー部位は、分子量10,000以下であり、かつ５０個以下又は４９個以下のアミノ酸残基からなるリンカー部位であり得て、そのアミノ酸配列の少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は１００％がアラニン（A）及びプロリン（P）から選択されるアミノ酸残基からなり得る。この場合、プロリン残基は、リンカー部位のアミノ酸配列において、１０％超かつ７５％未満を構成し得る。例えば、プロリン残基は、リンカー部位のアミノ酸配列において、約１０％超、約１２％超、約１４％超、約１８％超、約２０％超、約２２％超、約２３％超、約２４％

超、又は約２５％超を構成してもよく、約７５％未満、約７０％未満、約６５％未満、約６０％未満、約５５％未満、約５０％未満、約４８％未満、約４６％未満、約４４％未満、約４２％未満、約４１％未満、約４０％未満、約３９％未満、約３８％未満、約３７％未満、約３６％未満、又は約３５％未満を構成してもよい。また、アラニン残基は、約２５％超、約３０％超、約３５％超、約４０％超、約４５％超、約５０％超、約５２％超、約５４％超、約５６％超、約５８％超、約５９％超、約６０％超、約６１％超、約６２％超、約６３％超、約６４％超、又は約６５％超を構成してもよく、約９０％未満、約８８％未満、約８６％未満、約８４％未満、約８２％未満、約８０％未満、約７９％未満、約７８％未満、約７７％未満、約７６％未満、又は約７５％未満を構成してもよい。

リンカー部位のアミノ酸配列において、アラニン、セリンおよびプロリンとは異なるアミノ酸残基は、Ａｒｇ、Ａｓｎ、Ａｓｐ、Ｃｙｓ、Ｇｌｎ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｔｈｒ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ及びＶａｌからなる群から選択することができる。このようなアラニン、セリンおよびプロリンとは異なるアミノ酸残基としては、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、ＴｙｒもしくはＴｒｐのような疎水性側鎖を有さないもの、及び／又はＬｙｓ、Ａｒｇ、ＡｓｐもしくはＧｌｕのような荷電を有する側鎖を有さないものが好ましい。

[0048] 本発明のペプチド分子の一実施態様において、リンカー部位は、複数のアミノ酸リピートを含み、前記アミノ酸リピートがアラニン（A）、プロリン（P）及びセリン（S）からなり、前記アミノ酸リピートにおいて同一のアミノ酸残基が連続する数が６残基以下、５残基以下、４残基以下、又は３残基以下であり得る。

本発明のペプチド分子の一実施態様において、リンカー部位は、複数のアミノ酸リピートを含み、前記アミノ酸リピートがアラニン（A）及びプロリン（P）からなり、前記アミノ酸リピートにおいて同一のアミノ酸残基が連続する数が６残基以下、５残基以下、４残基以下、又は３残基以下であり得る。

本発明のペプチド分子の一実施態様において、リンカー部位は、AP、AAP、AS、ASP及びASSからなる群から選択されるアミノ酸配列を２つ以上繰り返して含むものであり得る。

本発明のペプチド分子の一実施態様において、リンカー部位は、グリシン（G）とセリン（S）から構成される配列を含むものであり得る。この場合、リンカー部位は、GGGGS、GGGS、GGS、及びGSからなる群から選択されるアミノ酸配列を繰り返し含み得る。

本発明の製造方法の一実施態様において、リンカー部位は、グリシンを連続して含むものであり得、また、グリシンのみからなるものであり得る。

本発明の製造方法の一実施態様において、リンカー部位は、EAAAKで示されるアミノ酸配列を繰り返し含み得る。

本発明の製造方法の一実施態様において、リンカー部位のアミノ酸配列としては、A、P及びSからなるもの、A及びPからなるもの、又はGGGGSで示される配列の繰り返しからなるものが好ましいが、これらに限定されるものではない。

本発明のペプチド分子の一実施態様において、リンカー部位の長さは、５０個以下のアミノ酸残基からなり得るが、例えば、リンカー部位は、４９個以下、４０個以下、３５個以下、３０個以下、又は２５個以下のアミノ酸残基からなることができる。

本発明の製造方法の一実施態様において、リンカー部位は、１個以上のアミノ酸残基からなり得るが、例えば、リンカー部位は、４個以上、８個以上、１２個以上、又は１６個以上のアミノ酸残基からなることができる。

[0049] 本発明のペプチド分子の一実施態様において、リンカー部位の具体例としては、以下のアミノ酸配列を含むものや、以下のアミノ酸配列からなるものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。AAPAAPAP（配列番号：７４）、AAPAAPAPAAPAAPAP（配列番号：７５）、AAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPA（配列番号：７６）、SAPSPSSAPASASAPASPASASASASPASSPASASSASPAASSASPASS（配列番号：７７）、AAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPA

APAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAP
APAAPA（配列番号：７８）、SAPSPSSAPASASAPASPASASASASPASSPASASSASPAASS
ASPASSSASPSAPAAPSASAAPSASPASSSPAPASAPSPAAAASSPSPAPSSASSAA（配列番号：
７９）、AAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAA
PAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAA
PAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPA
P（配列番号：８０）、AAPAAPAPAAPAAPAPAAPA（配列番号：７）、AAPAAPAPAA
PAAPAPAAPAAP（配列番号：８）、AAPAAPAPAAPAAP（配列番号：９）、AAPAAAP
APAAPAAPAPAAP（配列番号１０）、AAAPAAAPAAAPAAAPAAAP（配列番号１１）、
AAPAAPAAPAAPAAPAAPAAPAAP（配列番号１２）、APAAAPAPAAAPAPAAAPAPAAAP（
配列番号１３）、AAAPAAPAAPPAAAAPAAPAAPPA（配列番号１４）、及びAPAPAPA
PAPAPAPAPAPAP（配列番号１５）、ASPAAPAPASPAAPAPSAPA（配列番号１６）、
AAPASPAPAAPSAPAPAAPS（配列番号１７）、APSSPSPSAPSSPSPASPSS（配列番号
１８）、SAPSSPSPSAPSSPSPASPS（配列番号１９）、SSPSAPSPSSPASPSPSSPA（
配列番号２０）、AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA（配列番号２１）、及びASAAAPA
AASAAASAPSAAA（配列番号２２）、並びにこれらの円順列変異配列から選択さ
れるアミノ酸配列。

円順列変異配列は、AAPAAPAPAAPAAPAPAAPA（配列番号：７）を例にして説明すれば、例えば、上記の配列の第１のアラニンを除去すること及び上記の配列の末端に別のアラニンを付加することによって容易に作製され得る。配列番号：７のこのような円順列変異配列は、APAAPAPAAPAAPAPAAPAA（配列番号：２３）となる。さらに、配列番号７の環状にアミノ酸残基の順序を変えられた円順列変異配列の限定されない例として、以下のものが挙げられる。P
AAPAPAAPAAPAPAAPAAA（配列番号：２４）、AAPAPAAPAAPAPAAPAAAP（配列番号
：２５）、APAPAAPAAPAPAAPAAAPA（配列番号：２６）、PAPAAPAAPAPAAPAAAPA
A（配列番号：２７）、APAAPAAPAPAAPAAAPAAP（配列番号：２８）、PAAPAAPA
PAAPAAAPAAPA（配列番号：２９）、AAPAAPAPAAPAAAPAAPAP（配列番号：３０
）、APAAPAPAAPAAAPAAPAPA（配列番号：３１）、及びPAAPAPAAPAAAPAAPAPAA

（配列番号：３２）。

実施例

[0050] 以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

なお、実施例において用いたHGFは、全てリコンビナントヒトHGF（rhHGF, R&D Systems）であり、本明細書及び図面において、リコンビナントヒトHGFを単にHGFと表記する。

[0051] 参考例１：tatABC遺伝子増幅用ベクターpPK6の短縮化ベクター（pPK10）の構築

WO2016/171224に記載のpPK6ベクターは、Tat系分泌装置をコードするtatABC遺伝子の増幅用ベクターである。pPK6から不要配列を除去することで、以下のように短縮化ベクターを構築した。

まず、pPK6を鋳型として除去領域の５’側を配列番号：３３と配列番号：３４に記載のプライマーで、３’側を配列番号：３５と配列番号：３６に記載のプライマーでそれぞれ増幅した。増幅した2つのDNA断片を、インフュージョン反応によりpPK6のSalI-SalI部位に導入し、pPK6から548塩基を除去したプラスミドを取得した。このプラスミドをpPK6bと名付けた。

次に、pPK6bを鋳型として、除去領域の５’側を配列番号：３７と配列番号：３８に記載のプライマーで、３’側を配列番号：３９と配列番号：４０に記載のプライマーでそれぞれ増幅した。増幅した2つのDNA断片を、インフュージョン反応によりpPK6bのClaI-SpeI部位に導入し、pPK6bから更に310塩基を除去したプラスミドを構築した。インフュージョン反応にはIn-Fusion（登録商標）HD Cloning Kit（Takara Bio）を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。

このようにして、pPK6ベクターから不要な配列858塩基を除去して短縮化したプラスミドを構築した。このベクターをpPK10と名付けた。

[0052]

[表1]

プライマー配列番号	塩基配列
配列番号：３３	tcagaggaatgtcgactgctcgcaaccggcccgt
配列番号：３４	cctacattcagcgcaggttcccctagagcacgt
配列番号：３５	tgcgctgaatgtagggaag
配列番号：３６	atcgctgcaggtcgactctagaggatccccggaa
配列番号：３７	cttcccatacaatcgatagattgtcgcacctgattg
配列番号：３８	cctcaggctggtgttgggcgagctcgaattcgt
配列番号：３９	aacaccagcctgaggcaa
配列番号：４０	gatcttcgggactagttactttcaaatgctcagcatg

[0053] 実施例１：FBP-PASダイマーペプチドの設計およびC. glutamicumにおけるその分泌発現

（１－１）FBP-PASダイマーペプチドの設計の概要

2つのFGFR1結合環状ペプチド（FBP）をPASリンカーで結合したペプチド分子を一つのポリペプチドとしてC. glutamicumで発現する。そのため、「第一のFBP」－「PASリンカー」－「第二のFBP（上記第一のFBPと同一の配列）」となるようペプチド配列を設計した。すなわち、第一のFBPのC末端とPASリンカーのN末端が、第二のFBPのN末端とPASリンカーのC末端がアミド結合で結合されており、一本のポリペプチド鎖としてC. glutamicumで発現可能である。

[0054] （１－２）FBP-PASダイマーペプチドの調製

調製したFBP-PASダイマーペプチドは以下のとおりである。

（ａ）FBP-PAS

RPGCGPRKPRTPKKCGSHGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAGRPGCGPRKPRTPKKCGSH（配列番号：４１）

[0055] （１－３）FBP-PASダイマーペプチドの発現

Corynex（登録商標）を用いてFBP-PASダイマーペプチドの発現検討を行った。以下、Corynex（登録商標）による発現検討の実施例を記載する。

[0056] （１－４）TorAシグナル配列を用いたFBP-PASダイマーペプチドの分泌発現プラスミドの構築

FBP-PASダイマーペプチドとして、上記（ａ）FBP-PAS（以下、「FBP-PAS」と表記することがある。）のアミノ酸配列を設計し、このタンパク質をコー

ドする塩基配列をC. glutamicumのコドン使用頻度を考慮して設計した。さらに、C. glutamicumによる分泌発現を可能とするよう、以下の発現カセットを設計した。

FBP-PASは、E. coli由来のTorAのシグナルペプチド39アミノ酸残基とFBP-PASとの融合タンパク質（以下、「TorAss-FBP-PAS」と表記する。）として分泌発現させた。設計したTorAss-FBP-PASをコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：４２、４３に示す。

[0057] TorAss-FBP-PASをコードする塩基配列

atgaacaataacgatctctttcaggcatcacgtcggcgttttctggcacaactcggcggcttaaccgtc
gccgggatgctggggccgtcattgttaacgccgcgacgtgcgactgcgcgtcctggttgtggtcctcgc
aagccccgcaccctaagaaatgtggttctcacggcgccgctcctgccgcacccgcacccgctgctcca
gcagccccagccccagctgcaccagcaggtcgcccaggctgtggtccccgcaaaccccgcaccctaag
aaatgtggctctcactaa（配列番号：４２）

TorAss-FBP-PASのアミノ酸配列

MNNNDLFQASRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRATARPGCGPRKPRTPKKCGSHGAAPAAPAPAAP
AAPAPAAPAGRPGCGPRKPRTPKKCGSH（配列番号：４３）

[0058] TorAss-FBP-PASに記載の塩基配列の上流にC. glutamicum ATCC13869株由来のcspB遺伝子のプロモーターを繋げ、さらに5’-側にKpnIサイト、3’-側にApaIサイトを付加した、TorAss-FBP-PASの発現カセットを設計し、全合成した。全合成したDNA断片（TorAss-FBP-PASの発現カセット）を、参考例１に記載のpPK10のKpnI-ApaI部位に挿入することによって、TorAシグナル配列を利用したFBP-PASダイマーペプチドの分泌発現プラスミドであるpPK10_TorAss-FBP-PASを構築した。挿入断片の塩基配列決定の結果、設計通りのTorAss-FBP-PASの発現カセットが構築されていることを確認した。塩基配列の決定はBigDye（登録商標）Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）と3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を用いて行った。

[0059] （１－５）C. glutamicumにおけるFBP-PASダイマーペプチドの分泌発現

上記で構築したpPK10_TorAss-FBP-PASを用いて、WO2016/171224に記載のC.

glutamicum YDK0107株を形質転換し、YDK0107/pPK10_TorAss-FBP-PAS株を得た。

得られた形質転換体を、25 mg/Lのカナマイシンを含むMMTG液体培地（グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3 g、硫酸アンモニウム 30 g、リン酸二水素カリウム 1.5 g、硫酸鉄七水和物 0.03 g、硫酸マンガン五水和物 0.03 g、チアミン塩酸塩 0.45 mg、ビオチン 0.45 mg、DL-メチオニン 0.15 g、大豆塩酸加水分解液（全窒素量 0.2 g）、炭酸カルシウム 50 g、水で1LにしてpH7.0に調整）で30℃、72時間培養した。

培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清6.5 μLをNuPAGE（登録商標）12% Bis-Tirs Gel (Thermo Fisher Scientific) を用いて還元SDS-PAGEに供してからQuick-CBB (Wako) にて染色を行った。その結果、YDK0107/pPK10_TorAss-FBP-PAS株の培養上清中にFBP-PASと推定されるタンパク質バンドが検出された（図１、レーン２～５）。

[0060] （１－６）FBP-PASダイマーペプチドの精製

上記で得られたFBP-PASを含む培養上清を、透析膜（MWCO = 3.5 kDa、Spectrum社）を用いてPBS (Mg-/Ca-) 緩衝液中で2日間透析を行うことで精製を行った。

[0061] 実施例２：FBP-PASダイマーペプチドの分子量およびジスルフィド環状構造の確認

FBP-PASダイマーペプチド溶液に、5 mMのTris(2-carboxyethyl)phosphine Hydrochloride (TCEP-HCl)を添加し、48時間室温でインキュベートすることでジスルフィド結合の還元を行った。FBP-PASおよびTCEP-HCl処理を行ったFBP-PASダイマーペプチドにそれぞれα-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (CHCA) を混合し、MALDI-TOF-MS (Shimadzu, AXIMA-TOF2)で分子量の測定を行った。

図２に示すように、TCEP-HClで還元する前は分子内で2つのジスルフィド結合を形成しているFBP-PASダイマーペプチドの分子量（m/z 5621）に近い値が得られた。また、TCEP-HClで還元後は全てのジスルフィド結合が還元された分子量（m/z 5625）に近い値が得られた。

これらの結果から、Corynex（登録商標）により発現したFBP-PASダイマーペプチドは設計通りのペプチド配列を有しており、さらに分子内に2つのジスルフィド結合を含む構造であることが確認された。

[0062] 実施例３：FBP-PASダイマーペプチドのFGFR阻害活性評価

FBP-PASダイマーペプチドと化学合成したFBPモノマーペプチドのFGFRに対する阻害活性をルシフェラーゼアッセイによって評価した。Opti-MEM培地（Thermo Fisher Scientific社）25 μLに対し、0.6 μLのAttractene Transfection Reagent（QIAGEN社）を添加し、室温で5分インキュベートを行った。上記混合溶液に対し、Opti-MEM 25 μLと1 μLのSRE reporter vector（QIAGEN社）の混合溶液を加え、室温で20分インキュベートを行った。この混合溶液を96-well plateに添加し、その上から40,000 cell/wellのHEK293E細胞を播種し、37 ℃、5% CO_2インキュベータ内で終夜インキュベートを行った。トランスフェクション後、培養上清を全て除去し、0.5% FBS（Thermo Fisher Scientific社）、1% 非必須アミノ酸溶液（Thermo Fisher Scientific社）およびペニシリン－ストレプトマイシン（ナカライテスク社）を含むOpti-MEM培地（評価基礎培地）を100 μL添加し、37 ℃で4時間培養することで、細胞を飢餓状態にした。

bFGFを0-10 ng/mL含む評価基礎培地にFBP-PASダイマーペプチドまたはFBPモノマーペプチドを10 μM添加し、細胞に100 μL添加した。37 ℃、5% CO_2インキュベータ内で終夜培養することで細胞への刺激を行った。

シグナル強度の検出にはDual-Luciferase Reporter Assay System（Promega社）を使用した。100 μLの培地上清を除去し、Glo reagentを50 μL添加し、室温で10分細胞を溶解した。細胞の溶解液から発せられるFirefly luciferaseの発光をプレートリーダーで検出することで、FGFR-Erk-SRE経路の活性化を定量した。続いて、50 μLのGlo & Stop reagent溶液を添加し、10分後に内部標準であるRenilla luciferaseの発光を検出し、細胞数の定量を行った。SRE activity = (Firefly luciferaseの発光強度)/(Renilla luciferaseの発光強度)として、各サンプルのシグナル活性を定量した。評価化合物を加え

ていないサンプルに対する相対的なシグナル活性値を求め、相対的受容体活性（Relative reporter activity）とした。

図３に示す通り、FBP-PASダイマーペプチドはFBPモノマーペプチドに比べて同量のbFGFによるFGFRシグナルを強く阻害することが明らかになった。これらの結果より、FBP-PASダイマーペプチドはFGFRを阻害し、FBPモノマーペプチドに比べて高い阻害活性を有することが明らかになった。

[0063] 実施例４：HGF-PASダイマーペプチドの設計およびC. glutamicumにおけるその分泌発現

（４－１）HGF-PASダイマーペプチドの設計の概要

K. Ito, et al. Nat. Commun. 6, 6373, 2015で報告されているMet結合環状ペプチドaMD4をPEGリンカーによってダイマー化したペプチドダイマー分子を、一つのポリペプチド鎖としてC. glutamicumで発現することは、以下の理由から行うことができない。

（１）aMD4はN末端のアミノ基に付加したクロロアセチル基と配列中のシステイン側鎖のスルフヒドリル基との反応で形成される分子内チオエーテル結合により環状化されているが、チオエーテル結合はC. glutamicumで発現することができない。

（２）ダイマー化はBis-Maleimide-PEGリンカーを用いて環状ペプチドのC末端同士を結合することで達成されており、C. glutamicumで発現することができない。

そのため、次のように分子に変換を加えることで、発現できる形にデザインした。上記（１）に関してはチオエーテル結合を２つのシステイン側鎖のスルフヒドリル基によるジスルフィド結合に変換した。ジスルフィド結合に変換することで環状化部位が２原子分長くなるが、N末端側のシステインの次の残基（aMD4の場合はチロシン）を削除することで環状化部位が１原子分短くなるようにデザインした。上記（２）に関してはPEGリンカーの代わりにPAS配列を用いること、さらに一本のポリペプチド鎖として発現できるように「第一のジスルフィド変換aMD4」－「PASリンカー」－「第二のジスルフィド変

換aMD4」となるようペプチド配列を設計することで対応した。すなわち、第一のジスルフィド変換aMD4のC末端とPASリンカーのN末端が、第二のジスルフィド変換aMD4のN末端とPASリンカーのC末端がアミド結合で結合されており、一本のポリペプチド鎖として発現可能である。

[0064] （４－２）HGF-PASダイマーペプチドの調製

調製したHGF-PASダイマーペプチドは以下のとおりである。

（ｂ）PAS-aMD4-PEG11

CYRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPGCYRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：４４）

（ｃ）PAS-aMD4dY-PEG11

CRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPGCRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：４５）

（ｄ）PAS-aMD4-PEG3

CYRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPGCYRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：４６）

（ｅ）AET-PAS-aMD4-PEG11

AETCYRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPGCYRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：４７）

（ｆ）AET-PAS-aMD4dY-PEG11

AETCRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPGCRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：４８）

（ｇ）AET-PAS-aMD4-PEG3

AETCYRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPGCYRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：４９）

[0065] （４－３）HGF-PASダイマーペプチドの発現

Corynex（登録商標）を用いてこれらのHGF-PASダイマーペプチドの発現検討を行った。以下、Corynex（登録商標）による発現検討の実施例を記載する。

[0066] （４－４）TorAシグナル配列を利用したPAS-aMD4-PEG11、PAS-aMD4dY-PEG11

、およびPAS-aMD4-PEG3の各分泌発現プラスミドの構築

HGF-PASダイマーペプチドとして、上記（ｂ）PAS-aMD4-PEG11（以下、「PAS-aMD4-PEG11」と表記することがある。）、（ｃ）PAS-aMD4dY-PEG11（以下、「PAS-aMD4dY-PEG11」と表記することがある。）、および（ｄ）PAS-aMD4-PEG3（以下、「PAS-aMD4-PEG3」と表記することがある。）の3種類のアミノ酸配列をそれぞれ設計し、これらタンパク質をコードする塩基配列をC. glutamicumのコドン使用頻度を考慮して設計した。さらに、C. glutamicumによる分泌発現を可能とするよう、それぞれ以下の発現カセットを設計した。

PAS-aMD4-PEG11は、E. coli由来のTorAのシグナルペプチド39アミノ酸残基とPAS-aMD4-PEG11の融合タンパク質（以下、「TorAss-PAS-aMD4-PEG11」と表記する。）として分泌発現させた。設計したTorAss-PAS-aMD4-PEG11をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：５０、５１に示す。

[0067] TorAss-PAS-aMD4-PEG11をコードする塩基配列

atgaacaataacgatctctttcaggcatcacgtcggcgttttctggcacaactcggcggcttaaccgtc
gccgggatgctggggccgtcattgttaacgccgcgacgtgcgactgcgtgttaccgtcaattcaaccgt
cgcacccacgaagtttggaacctggactgtggcgcagcacccgcagccccagcccccgcagcacctgca
gccccagcaccagctgcaccagccgctccaggctgctaccgtcagttcaaccgccgcacccacgaagtt
tggaatttggattgctaa（配列番号：５０）

TorAss-PAS-aMD4-PEG11のアミノ酸配列

MNNNDLFQASRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRATACYRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPA
APAPAAPAAPGCYRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：５１）

[0068] PAS-aMD4dY-PEG11は、E. coli由来のTorAのシグナルペプチド39アミノ酸残基とPAS-aMD4dY-PEG11の融合タンパク質（以下、「TorAss-PAS-aMD4dY-PEG11」と表記する。）として分泌発現させた。設計したTorAss-PAS-aMD4dY-PEG11をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：５２、５３に示す。

[0069] TorAss-PAS-aMD4dY-PEG11をコードする塩基配列

atgaacaataacgatctctttcaggcatcacgtcggcgttttctggcacaactcggcggcttaaccgtc
gccgggatgctggggccgtcattgttaacgccgcgacgtgcgactgcgtgccgtcagttcaaccgtcgc
acccacgaagtttggaatctggactgtggcgcagcccccgcagcacccgctcccgcagcacccgcagct
ccagcaccagcagccccagcagcaccaggctgccgccagttcaaccgtcgcacccacgaagtttggaat
ttggattgttag（配列番号：５２）

TorAss-PAS-aMD4dY-PEG11のアミノ酸配列

MNNNDLFQASRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRATACRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAA
PAPAAPAAPGCRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：５３）

[0070] PAS-aMD4-PEG3は、E. coli由来のTorAのシグナルペプチド39アミノ酸残基とPAS-aMD4-PEG3の融合タンパク質（以下、「TorAss-PAS-aMD4-PEG3」と表記する。）として分泌発現させた。設計したTorAss-PAS-aMD4-PEG3をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：５４、５５に示す。

[0071] TorAss-PAS-aMD4-PEG3をコードする塩基配列

atgaacaataacgatctctttcaggcatcacgtcggcgttttctggcacaactcggcggcttaaccgtc
gccgggatgctggggccgtcattgttaacgccgcgacgtgcgactgcgtgttaccgtcagttcaaccgc
cgtacccacgaagtctggaacctggattgtggtgccgcccccgccgctcccgctcccgccgctccggca
gcccctggctgctaccgtcagtttaaccgtcgcacccacgaagtctggaacctggattgctaa（配列
番号：５４）

TorAss-PAS-aMD4-PEG3のアミノ酸配列

MNNNDLFQASRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRATACYRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPA
APGCYRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：５５）

[0072] TorAss-PAS-aMD4-PEG11、TorAss-PAS-aMD4dY-PEG11、およびTorAss-PAS-aMD4-PEG3に記載の塩基配列の上流にC. glutamicum ATCC13869株由来のcspB遺伝子のプロモーターを繋げ、さらに5’-側にKpnIサイト、3’-側にApaIサイトを付加した、各HGF-PASダイマーペプチドの発現カセットを設計し、全合成した。全合成したDNA断片（HGF-PASダイマーペプチドの発現カセット）を、参考例１に記載のpPK10のKpnI-ApaI部位に挿入することによって、TorAシグナル配列を利用した各HGF-PASダイマーペプチドの分泌発現プラスミドである

pPK10_TorAss-PAS-aMD4-PEG11、pPK10_TorAss-PAS-aMD4dY-PEG11、およびpPK10_TorAss-PAS-aMD4-PEG3をそれぞれ構築した。挿入断片の塩基配列決定の結果、それぞれ設計通りのHGF-PASダイマーペプチドの発現カセットが構築されていることを確認した。塩基配列の決定はBigDye（登録商標）Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) と3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。

[0073] （４－５）C. glutamicumにおける各HGF-PASダイマーペプチドの分泌発現

上記で構築したpPK10_TorAss-PAS-aMD4-PEG11、pPK10_TorAss-PAS-aMD4dY-PEG11、およびpPK10_TorAss-PAS-aMD4-PEG3を用いて、WO2016/171224に記載のC. glutamicum YDK0107株を形質転換し、YDK0107/pPK10_TorAss-PAS-aMD4-PEG11株、YDK0107/pPK10_TorAss-PAS-aMD4dY-PEG11株、およびYDK0107/pPK10_TorAss-PAS-aMD4-PEG3株を得た。

得られた各形質転換体を、25 mg/Lのカナマイシンを含むMMTG液体培地（グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3 g、硫酸アンモニウム 30 g、リン酸二水素カリウム 1.5 g、硫酸鉄七水和物 0.03 g、硫酸マンガン五水和物 0.03 g、チアミン塩酸塩 0.45 mg、ビオチン 0.45 mg、DL-メチオニン 0.15 g、大豆塩酸加水分解液（全窒素量 0.2 g）、炭酸カルシウム 50 g、水で1 Lにしてp H7.0に調整）でそれぞれ30℃、72時間培養した。

培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清6.5 μLをNuPAGE（登録商標）12% Bis-Tirs Gel (Thermo Fisher Scientific) を用いて還元SDS-PAGEに供してからQuick-CBB (Wako) にて染色を行った。その結果、YDK0107/pPK10_TorAss-PAS-aMD4-PEG11株の培養上清中にPAS-aMD4-PEG11と推定されるタンパク質バンド（図４、レーン２～５）、YDK0107/pPK10_TorAss-PAS-aMD4dY-PEG11株の培養上清中にPAS-aMD4dY-PEG11と推定されるタンパク質バンド（図４、レーン６～９）、およびYDK0107/pPK10_TorAss-PAS-aMD4-PEG3株の培養上清中にPAS-aMD4-PEG3と推定されるタンパク質バンドがそれぞれ検出された（図４、レーン１０～１３）。

[0074] （４－６）CspBシグナル配列を利用したAET-PAS-aMD4-PEG11、AET-PAS-aMD4d

Y-PEG11、およびAET-PAS-aMD4-PEG3の各分泌発現プラスミドの構築

HGF-PASダイマーペプチドとして、上記（ｅ）AET-PAS-aMD4-PEG11（以下、「AET-PAS-aMD4-PEG11」と表記することがある。）、（ｆ）AET-PAS-aMD4dY-PEG11（以下、「AET-PAS-aMD4dY-PEG11」と表記することがある。）、および（ｇ）AET-PAS-aMD4-PEG3（以下、「AET-PAS-aMD4-PEG3」と表記することがある。）の3種類のアミノ酸配列をそれぞれ設計し、これらタンパク質をコードする塩基配列をC. glutamicumのコドン使用頻度を考慮して設計した。さらに、C. glutamicumによる分泌発現を可能とするよう、それぞれ以下の発現力セットを設計した。

AET-PAS-aMD4-PEG11は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-PAS-aMD4-PEG11の融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-PAS-aMD4-PEG11」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-PAS-aMD4-PEG11をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：５６、５７に示す。

[0075] CspBss-AET-PAS-aMD4-PEG11をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc

gtagctatcccagcattcgctgcagagacctgttaccgtcaattcaaccgtcgcacccacgaagtttgg

aacctggactgtggcgcagcacccgcagccccagcccccgcagcacctgcagccccagcaccagctgca

ccagccgctccaggctgctaccgtcagttcaaccgccgcacccacgaagtttggaatttggattgctaa

（配列番号：５６）

CspBss-AET-PAS-aMD4-PEG11のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETCYRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAA

PAAPGCYRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：５７）

[0076] AET-PAS-aMD4dY-PEG11は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-PAS-aMD4dY-PEG11の融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-PAS-aMD4dY-PEG11」と表記す。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-PAS-aMD4dY-PEG11をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：５８、５９に示す。

[0077] CspBss-AET-PAS-aMD4dY-PEG11をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagacctgccgtcagttcaaccgtcgcacccacgaagtttggaat
ctggactgtggcgcagcccccgcagcacccgctcccgcagcacccgcagctccagcaccagcagcccca
gcagcaccaggctgccgccagttcaaccgtcgcacccacgaagtttggaatttggattgttag（配列
番号：５８）

CspBss-AET-PAS-aMD4dY-PEG11のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETCRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAAP
AAPGCRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：５９）

[0078] AET-PAS-aMD4-PEG3は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-PAS-aMD4-PEG3の融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-PAS-aMD4-PEG3」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-PAS-aMD4-PEG3をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：６０、６１に示す。

[0079] CspBss-AET-PAS-aMD4-PEG3をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagacctgttaccgtcagttcaaccgccgtacccacgaagtctgg
aacctggattgtggtgccgccccgccgctcccgctcccgccgctccggcagcccctggctgctaccgt
cagtttaaccgtcgcacccacgaagtctggaacctggattgctaa（配列番号：６０）

CspBss-AET-PAS-aMD4-PEG3のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETCYRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPGCYR
QFNRRTHEVWNLDC（配列番号：６１）

[0080] AET-PAS-aMD4-PEG11、AET-PAS-aMD4dY-PEG11、およびAET-PAS-aMD4-PEG3に記載の塩基配列の上流にC. glutamicum ATCC13869株由来のcspB遺伝子のプロモーターを繋げ、さらに5’-側にKpnIサイト、3’-側にBamHIサイトを付加した、各HGF-PASダイマーペプチドの発現カセットを設計し、全合成した。全合成したDNA断片（HGF-PASダイマーペプチドの発現カセット）を、特開平9-322774に記載のpPK4のKpnI-BamHI部位に挿入することによって、CspBシグナル配

列を利用した各HGF-PASダイマーペプチドの分泌発現プラスミドであるpPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4-PEG11、pPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4dY-PEG11、およびpPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4-PEG3をそれぞれ構築した。挿入断片の塩基配列決定の結果、それぞれ設計通りのHGF-PASダイマーペプチドの発現カセットが構築されていることを確認した。塩基配列の決定はBigDye（登録商標）Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) と3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。

[0081] （４－７）C. glutamicumにおける各HGF-PASダイマーペプチドの分泌発現

上記で構築したpPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4-PEG11、pPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4dY-PEG11、およびpPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4-PEG3を用いて、WO2016/171224に記載のC. glutamicum YDK010::phoS(W302C)株を形質転換し、YDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4-PEG11株、YDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4dY-PEG11株、およびYDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4-PEG3株を得た。

得られた各形質転換体を、25 mg/Lのカナマイシンを含むMMTG液体培地（グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3 g、硫酸アンモニウム 30 g、リン酸二水素カリウム 1.5 g、硫酸鉄七水和物 0.03 g、硫酸マンガン五水和物 0.03 g、チアミン塩酸塩 0.45 mg、ビオチン 0.45 mg、DL-メチオニン 0.15 g、大豆塩酸加水分解液（全窒素量 0.2 g）、炭酸カルシウム 50 g、水で1 Lにしてp H7.0に調整）でそれぞれ30℃、72時間培養した。

培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清6.5 μLをNuPAGE（登録商標）12% Bis-Tirs Gel (Thermo Fisher Scientific) を用いて還元SDS-PAGEに供してからQuick-CBB (Wako) にて染色を行った。その結果、YDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4-PEG11株の培養上清中にAET-PAS-aMD4-PEG11と推定されるタンパク質バンド（図５、レーン２～５）、YDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4dY-PEG11株の培養上清中にAET-PAS-aMD4dY-PEG11と推定されるタンパク質バンド（図５、レーン６～９）、およびYDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4-PEG3株の培養上清中にAET-P

AS-aMD4-PEG3と推定されるタンパク質バンドがそれぞれ検出された（図５、レーン１０～１３）。

[0082] （４－８）HGF-PASダイマーペプチドの精製

上記で得たHGF-PASダイマーペプチドの精製は、AKTA explorer（GE Healthcare)とSuperdex 75 10/300 GLカラム（GE Healthcare）を用いて行った。1 mLの培養上清をAKTA explorerにインジェクトし、PBS（10 mM phosphate buffer, 140 mM NaCl, pH 7.4）を流速0.5 mL/minの条件で流すことでタンパク質を分画することで、目的のHGF-PASダイマーペプチド画分を得た。

[0083] 実施例５：HGF-PASダイマーペプチドの分子量分析

AET-PAS-aMD4dY-PEG11、AET-PAS-aMD4-PEG11およびAET-PAS-aMD4-PEG3を、それぞれα-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (CHCA)を混合し、MALDI-TOF-MS (Shimadzu, AXIMA-TOF2)を用いて分子量の測定を行った。

図６に示すように、分子内で2つのジスルフィド結合を形成している酸化型の各ダイマーペプチドの分子量理論値（AET-PAS-aMD4dY-PEG11：m/z 6320, AET-PAS-aMD4-PEG11：m/z 6646, AET-PAS-aMD4-PEG3：m/z 6000）にほぼ同一の値が得られた。2つのジスルフィド結合を含む正しいアミノ酸配列のペプチドが発現できたことが確認された。

[0084] 実施例６：HGF-PASダイマーペプチドの活性評価

HGF-PASダイマーペプチドのMet活性化能をルシフェラーゼアッセイによって評価した。Opti-MEM培地（Thermo Fisher Scientific社）25 μLに対し、0.6 μLのAttractene Transfection Reagent（QIAGEN社）を添加し、室温で5分インキュベートを行った。上記混合溶液に対し、Opti-MEM 25 μLと1 μLのSRE reporter vector（QIAGEN社）の混合溶液を加え、室温で20分インキュベートを行った。この混合溶液を96-well plateに添加し、その上から40,000 cell/wellのHEK293E細胞を播種し、37 ℃、5% CO_2インキュベータ内で終夜インキュベートを行った。トランスフェクション後、培養上清を全て除去し、0.5% FBS（Thermo Fisher Scientific社）、1% 非必須アミノ酸溶液（Thermo Fisher Scientific社）およびペニシリン－ストレプトマイシン（ナカライテ

スク社）を含むOpti-MEM培地（評価基礎培地）を100 μL添加し、37 ℃で4時間培養することで、細胞を飢餓状態にした。

評価基礎培地に、0-200 ng/mLのHGF、または0-800 ng/mLのAET-PAS-aMD4dY-PEG11、AET-PAS-aMD4-PEG11、もしくはAET-PAS-aMD4-PEG3、または当該培地に対して10倍希釈されるようにPAS-aMD4dY-PEG11、PAS-aMD4-PEG11、もしくはPAS-aMD4-PEG3を含む培養上清を加え、その評価基礎培地を細胞に100 μL添加した。37 ℃、5% CO_2インキュベータ内で終夜培養することで細胞への刺激を行った。

シグナル強度の検出にはDual-Luciferase Reporter Assay System (Promega社）を使用した。100 μLの培地上清を除去し、Glo reagentを50 μL添加し、室温で10分細胞を溶解した。細胞の溶解液から発せられるFirefly luciferaseの発光をプレートリーダーで検出することで、HGF-Erk-SRE経路の活性化を定量した。続いて、50 μLのGlo & Stop reagent溶液を添加し、10分後に内部標準であるRenilla luciferaseの発光を検出し、細胞数の定量を行った。SRE activity = (Firefly luciferaseの発光強度)/(Renilla luciferaseの発光強度)として、各サンプルのシグナル活性を定量した。評価化合物を加えていないサンプルに対する相対的なシグナル活性値を求め、相対的受容体活性（Relative reporter activity）とした。

図７～９に示す通り、全てのHGF-PASダイマーペプチドはシグナル活性化能を有することが明らかになった。特に、AET-PAS-aMD4dY-PEG11およびPAS-aMD4dY-PEG11は100 ng/mL HGFと同程度の最大活性を有することが明らかになった。

[0085] 実施例７：HGF-PASダイマーペプチドの特異性評価

HGF-PASダイマーペプチドの受容体チロシンキナーゼ（RTK）特異性をProteome Profiler Human Phospho-RTK Array Kit（R&D Systems）を用いて評価した。

10 cm 細胞培養ディッシュにコンフルエントの状態になったHEK293E細胞を、0.5% FBS（Thermo Fisher Scientific社）およびペニシリンーストレプト

マイシン（ナカライテスク社）を含むD-MEM培地中で24時間培養することで飢餓状態にした。飢餓状態のHEK293E細胞を、200 ng/mLのAET-PAS-aMD4dY-PEG11で10分間刺激した。陽対照としては、100 ng/mLのHGFで同様に10分間刺激を行った。陰対照としてはPBSを加えて10分間刺激を行った（Mock群）。培地を除去し、PBSで一度細胞を洗浄した後、Protease inhibitor cocktail（ナカライテスク社）を添加したLysis buffer 17を1 mL加えることで細胞を溶解した。溶解液を14,000 Gで5分間遠心し、上清をライセートとして得た。

ライセートをProteome Profiler Human Phospho-RTK Array Kitを用いて解析した。化学発光の検出にはMolecular Imager ChemiDoc XRS System（Bio-Rad社）を用いた。図１０に示す通り、PBSで刺激を行った細胞（Mock群）はいずれのRTKも脱リン酸化状態であることが確認された。また、HGFで刺激を行うと、HGFの受容体であるMetが特異的にリン酸化されることが確認された。AET-PAS-aMD4dY-PEG11で刺激を加えると、HGFと同様、Metが特異的にリン酸化された。この結果から、AET-PAS-aMD4dY-PEG11はMet特異的な活性化を行うことが明らかになった。なお、図１１は、Proteome Profiler Human Phospho-RTK Array Kit（R&D Systems）の各アレイを示している。

[0086] 実施例８：HGF-PASダイマーペプチドの細胞増殖促進活性評価

HGFはMetを活性化することで細胞の増殖を促進することが報告されている（K. Ito, et al. Nat. Commun. 6, 6373, 2015）。そこで、HGF-PASダイマーペプチドがHGFと同様に細胞増殖を促進する活性を有するか、HuCCT1細胞培養を用いて評価を行った。

24-well細胞培養プレートに5% FBSを加えたRPMI1640培地（ナカライテスク社）を添加し、HuCCT1細胞を5,000 cell/wellで播種した。35 ng/mL HGFもしくは40 ng/mL AET-PAS-aMD4dY-PEG11を添加し、37 ℃、5% CO_2の条件下で5日間培養を行った。細胞は0.25% Trypsin/EDTA（Thermo Fisher Scientific社）で剥離し、Countess Automated Cell Counter（Thermo Fisher Scientific社）で細胞数の定量を行った（N=3）。

図１２に示す通り、HGFもしくはAET-PAS-aMD4dY-PEG11を添加して培養を行

った細胞は、いずれも非添加群(Mock)に対して2.5倍程度高い増殖能を示した。このことから、AET-PAS-aMD4dY-PEG11はHGF同様、細胞の増殖を促進することが明らかになった。

[0087] 実施例９：HGF-PASダイマーペプチドの遊走活性評価

HGFはMetを活性化することで細胞の遊走能を促進することが報告されている（K. Ito, et al. Nat. Commun. 6, 6373, 2015）。そこで、HGF-PASダイマーペプチドがHGFと同様に細胞の遊走を促進する活性を有するか、HuCCT1細胞培養を用いて評価を行った。

24-well用Transwellインサート（ポアサイズ3.0 μm, Corning社）に低血清培地（0.5% FBSを加えたRPMI1640培地）で懸濁したHuCCT1細胞20,000細胞を添加した。下層には100 ng/mL HGFもしくは200 ng/mL AET-PAS-aMD4dY-PEG11を加えた低血清培地を添加した。37 ℃、5% CO_2の条件下で24時間培養を行った後、TranswellインサートをPBSで3回洗浄し、0.5% Crystal Violet（ナカライテスク社）を加えたメタノールで10分間細胞固定及び染色を行った。固定化処理及び染色処理したTranswellインサートは蒸留水で洗浄した。インサート内部の細胞はスクレーパーで除去した。インサート外側に遊走し、染色された細胞をBZ-X顕微鏡（Keyence社）の明視野観察モードで撮影した。図１３にCrystal Violetで染色したTranswellインサート下部の明視野像および、遊走能の定量値を示す。

遊走能は（染色された領域の面積）/（インサート面積）とし、非添加群（Mock）の値に対する相対値（Relative migration efficiency）として算出した（N=2）。結果を図１４に示す。

HGFもしくはAET-PAS-aMD4dY-PEG11を添加して培養を行うと、Transwellインサート下部へ遊走する細胞の割合が増加したことから、AET-PAS-aMD4dY-PEG11がHGFと同様に細胞の遊走を促進することが明らかになった。

[0088] 実施例１０：HGF-PASダイマーペプチドの創傷治癒効果評価

HGFはMetを活性化することで細胞の創傷治癒能を促進することが報告されている（K. Ito, et al. Nat. Commun. 6, 6373, 2015）。そこで、HGF-PAS

ダイマーペプチドがHGFと同様に創傷治癒を促進するか、HuCCT1細胞培養を用いて評価を行った。

96-well細胞培養用プレートに10% FBSを加えたRPMI1640培地で懸濁したHuCCT1細胞を1ウェルあたり50,000細胞添加し、37 ℃、5% CO_2の条件下で一晩インキュベートした。1000 μLのThermo Scientific ART チップ（Thermo Fisher Scientific社）を用いて培養ウェルの中心部の細胞を削り取り、低血清培地（0.5% FBSを加えたRPMI1640培地）で洗浄した。33 ng/mLのHGFもしくは100 ng/mLのAET-PAS-aMD4dY-PEG11を加えた低血清培地を添加し、37 ℃、5% CO_2の条件下で培養を行った。細胞観察にはBioStudio-T（ニコン株式会社）を用い、1時間ごとに自動で細胞の写真を取得した。創傷治癒の速度（μm/h）は（（創傷作成後1時間における創傷の幅）-（創傷作成後7時間における創傷の幅））/6として算出した（N=4）。

図１５に創傷作成1時間後および9時間後の細胞の位相差画像を示し、図１６に創傷治癒の速度を示す。HGFもしくはAET-PAS-aMD4dY-PEG11を添加した細胞は1.6倍程度創傷治癒の速度が向上したことから、AET-PAS-aMD4dY-PEG11がHGFと同様に細胞の早朝治癒能を向上させることが明らかになった。

[0089] 実施例１１：HGF-PASダイマーペプチドの管状構造形成効果評価

コラーゲンゲルに内包したHUVEC細胞やHuCCT1細胞にHGFを作用させることで、管状構造を形成することが知られている（K. Ito, et al. Nat. Commun. 6, 6373, 2015）。また、HGFと同様の機能を有するMetフルアゴニストは上記細胞に管状構造を形成させることができる一方で、一部の機能のみを有する部分アゴニストは管状構造の形成を促進できないことが報告されている（W. Miao, et al. Int. J. Mol. Sci. 19, 3141, 2018）。そこで、HGF-PASダイマーペプチドがフルアゴニストと部分アゴニストのどちらであるか、HuCCT1細胞を用いた管状構造形成実験を用いて確認することとした。

CellMatrix type IA（新田ゼラチン社）8等量に対し、10倍濃縮D-MEM/F12（Thermo Fisher Scientific）1等量と再構成用緩衝液（22 g/L 重炭酸ナトリウム、47.7 g/L HEPES, 0.05N水酸化ナトリウム水溶液）1等量を順に氷上

で混合した。混合液1 mLあたり25,000細胞のHuCCT1細胞を添加し、氷上で混合した。48-well細胞培養用プレートに400 μLの上記混合液を添加し、37 ℃、5% CO_2条件下で4時間静置し、ゲル化させた。形成した細胞内包コラーゲンゲル上に10% FBSを加えたRPMI1640培地を500 μL添加した。細胞を刺激する群は35 ng/mLのHGFもしくは40 ng/mLのAET-PAS-aMD4dY-PEG11を加えて培養を行った。培地は3日を超えない頻度で全量を交換した。培養7日目にコラーゲンゲル内の細胞の形態を倒立顕微鏡で観察した。

図１７に培養7日目のHuCCT1細胞の形態を示す（スケールバー：500 μm）。HGFもしくはAET-PAS-aMD4dY-PEG11を添加した細胞は500-1000 μm程度の管状構造を形成したのに対し、非添加の細胞は球状の形態を示した。これらの結果から、AET-PAS-aMD4dY-PEG11はrhHGFと同様にHuCCT1細胞の管状構造形成を促進でき、Metに対するフルアゴニストであることが明らかになった。

[0090] 実施例１２：HGF-PASヘテロダイマーペプチドの設計およびC. glutamicumにおけるその分泌発現

（１２－１）HGF-PASヘテロダイマーペプチドの設計の概要

K. Ito, et al. Nat. Commun. 6, 6373, 2015で報告されているMet結合環状ペプチドのaMD4とaMD5を、ヘテロダイマー分子として発現した。K. Ito, et al. Nat. Commun. 6, 6373, 2015におけるダイマーペプチド合成法では、「aMD4」－「リンカー」－「aMD5」となるダイマーペプチドを選択的に合成することは困難である。すなわち、2種類のペプチドをPEG分子を介して結合させる場合、「aMD4」－「リンカー」－「aMD4」、「aMD4」－「リンカー」－「aMD5」、「aMD5」－「リンカー」－「aMD4」、「aMD5」－「リンカー」－「aMD5」の4種類のダイマーペプチドが産生されてしまう。そこで、本実施例では以下のデザインを施すことで、PASリンカーによってダイマー化したヘテロダイマーペプチドを一つのポリペプチド鎖としてC. glutamicumで発現することを可能にする。

（１）aMD4、aMD5はN末端のアミノ基に付加したクロロアセチル基と配列中のシステイン側鎖のスルフヒドリル基との反応で形成される分子内チオエーテ

ル結合により環状化されているため、２つのシステイン側鎖のスルフヒドリル基によるジスルフィド結合で環状化する。

（２）ダイマー化はBis-Maleimide-PEGリンカーを用いて環状ペプチドのC末端同士を結合することで達成されており、C. glutamicumで発現することができないため、aMD4のC末端とaMD5のN末端をPASリンカーペプチドで結合する。

以上のデザインにより、「aMD4」－「PASリンカー」－「aMD5」ペプチドを選択的に発現する。

[0091] （１２－２）HGF-PASヘテロダイマーペプチドの調製

調製したHGF-PASヘテロダイマーペプチドは以下のとおりである。

（ｈ）AET-PAS-aMD4_aMD5-PEG11

AETCYRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPGCYWYYAWDQTYKAFPC（配列番号：６２）

[0092] （１２－３）HGF-PASヘテロダイマーペプチドの発現

Corynex（登録商標）を用いてHGF-PASヘテロダイマーペプチドの発現検討を行った。以下、Corynex（登録商標）による発現検討の実施例を記載する。

[0093] （１２－４）CspBシグナル配列を利用したAET-PAS-aMD4_aMD5-PEG11の分泌発現プラスミドの構築

HGF-PASヘテロダイマーペプチドとして、上記（ｈ）AET-PAS-aMD4_aMD5-PEG11（以下、「AET-PAS-aMD4_aMD5-PEG11」と表記することがある。）のアミノ酸配列を設計し、このタンパク質をコードする塩基配列をC. glutamicumのコドン使用頻度を考慮して設計した。さらに、C. glutamicumによる分泌発現を可能とするよう、以下の発現カセットを設計した。

AET-PAS-aMD4_aMD5-PEG11は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-PAS-aMD4_aMD5-PEG11の融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-PAS-aMD4_aMD5-PEG11」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-PAS-aMD4_aMD5-PEG11をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：６３、６４に示す。

[0094] CspBss-AET-PAS-aMD4_aMD5-PEG11をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagacctgttaccgtcagttcaaccgtcgcacccacgaagtttgg
aacctggattgtggcgcagcccccgcagcccccgcacccgcagcccctgcagccccagccccagctgca
ccagcagcacctggctgttactggtattatgcgtgggatcagacctacaaagcgtttccgtgttag（
配列番号：６３）

CspBss-AET-PAS-aMD4_aMD5-PEG11のアミノ酸配列
MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETCYRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAA
PAAPGCYWYYAWDQTYKAFPC（配列番号：６４）

[0095] AET-PAS-aMD4_aMD5-PEG11に記載の塩基配列の上流にC. glutamicum ATCC13869株由来のcspB遺伝子のプロモーターを繋げ、さらに5’-側にKpnIサイト、3’-側にBamHIサイトを付加した、HGF-PASヘテロダイマーペプチドの発現カセットを設計し、全合成した。全合成したDNA断片（HGF-PASヘテロダイマーペプチドの発現カセット）を、特開平9-322774に記載のpPK4のKpnI-BamHI部位に挿入することによって、CspBシグナル配列を利用したHGF-PASヘテロダイマーペプチドの分泌発現プラスミドであるpPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4_aMD5-PEG1を構築した。挿入断片の塩基配列決定の結果、設計通りのHGF-PASヘテロダイマーペプチドの発現カセットが構築されていることを確認した。塩基配列の決定はBigDye（登録商標）Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）と3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を用いて行った。

[0096] （１２－５）C. glutamicumにおけるHGF-PASヘテロダイマーペプチドの分泌発現

上記で構築したpPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4_aMD5-PEG11を用いて、WO2016/171224に記載のC. glutamicum YDK010::phoS(W302C)株を形質転換し、YDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4_aMD5-PEG11株を得た。

得られた形質転換体を、25 mg/Lのカナマイシンを含むMMTG液体培地（グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3 g、硫酸アンモニウム 30 g、リン酸二水素カリウム 1.5 g、硫酸鉄七水和物 0.03 g、硫酸マンガン五水和物

0.03 g、チアミン塩酸塩 0.45 mg、ビオチン 0.45 mg、DL-メチオニン 0.15 g、大豆塩酸加水分解液（全窒素量 0.2 g）、炭酸カルシウム 50 g、水で1 Lにしてp H7.0に調整）でそれぞれ30℃、72時間培養した。

培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清6.5 μLをNuPAGE（登録商標）12% Bis-Tirs Gel (Thermo Fisher Scientific) を用いて還元SDS-PAGEに供してからQuick-CBB (Wako) にて染色を行った。その結果、YDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4_aMD5-PEG11株の培養上清中にAET-PAS-aMD4_aMD5-PEG11と推定されるタンパク質バンドが検出された（図１８、レーン２～５）。

[0097] 実施例１３：HGF-PASヘテロダイマーペプチドの分子量分析

AET-PAS-aMD4_aMD5-PEG11ペプチド発現上清とα-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (CHCA)を混合し、MALDI-TOF-MS (Shimadzu, AXIMA-TOF2)を用いて分子量の測定を行った。

図１９に示すように、分子内で2つのジスルフィド結合を形成している酸化型のHGF-PASヘテロダイマーペプチドの分子量理論値（AET-PAS-aMD4_aMD5-PEG11：m/z 6514）にほぼ同一の値が得られた。2つのジスルフィド結合を含む正しいアミノ酸配列のペプチドが発現できたことが確認された。

[0098] 実施例１４：HGF-PASダイマーペプチドリンカー改変体の設計およびC. glutamicumにおけるその分泌発現

（１４－１）HGF-PASダイマーペプチドリンカー改変体の設計の概要

HGF様活性を有するAET-PAS-aMD4dY-PEG11は、第一のaMD4dY環状ペプチド（配列番号：２で示される）と第二のaMD4dY環状ペプチドの間を22アミノ酸からなるPASリンカーで結合した構造を有している。このPASリンカーの長さを変えることで、HGF様活性が変わることが予想される。そこで、PASリンカー部位を8アミノ酸から200アミノ酸までのPAS反復配列に変えたリンカー改変体を設計した。

また、フレキシブルリンカーとしてはPASリンカーの他にグリシンとセリンの繰り返し配列であるGSリンカーも知られている。そこで、グリシン4残基と

セリン1残基（GGGGS）の繰り返し配列からなるGSリンカーのN末端およびC末端にaMD4dYを結合させたリンカー改変体、すなわち「第一のaMD4dY環状ペプチド」－「GSリンカー」－「第二のaMD4dY環状ペプチド」となるようペプチド配列を設計した。

[0099] （１４－２）HGF-PASダイマーペプチドリンカー改変体の調製

調製したHGF-PASダイマーペプチドリンカー改変体は以下のとおりである。

（ｉ）AET-aMD4dY-PAS8

AETCRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPGCRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：８１）

（ｊ）AET-aMD4dY-PAS49

AETCRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPA

GCRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：８２）

（ｋ）AET-aMD4dY-PAS100

AETCRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPA

APAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAGCRQFNRRTHEVWNLDC

（配列番号：８３）

（ｌ）AET-aMD4dY-PAS200

AETCRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPA

APAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAP

APAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAP

AAPAPAAPAAPAPGCRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：８４）

（ｍ）AET-aMD4dY-GS15

AETCRQFNRRTHEVWNLDCGGGGGSGGGGSGGGGSGCRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：８５）

（ｎ）AET-aMD4dY-GS22

AETCRQFNRRTHEVWNLDCGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGCRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：８６）

[0100] （１４－３）HGF-PASダイマーペプチドリンカー改変体の発現

Corynex（登録商標）を用いてこれらのHGF-PASダイマーペプチドリンカー

改変体の発現検討を行った。以下、Corynex（登録商標）による発現検討の実施例を記載する。

[0101] （１４－４）CspBシグナル配列を利用したAET-aMD4dY-PAS8、AET-aMD4dY-PAS49、AET-aMD4dY-PAS100、AET-aMD4dY-PAS200、AET-aMD4dY-GS15、およびAET-aMD4dY-GS22の各分泌発現プラスミドの構築

HGF-PASダイマーペプチドリンカー改変体として、上記（ｉ）AET-aMD4dY-PAS8（以下、「AET-aMD4dY-PAS8」と表記することがある。）、（ｊ）AET-aMD4dY-PAS49（以下、「AET-aMD4dY-PAS49」と表記することがある。）、（ｋ）AET-aMD4dY-PAS100（以下、「AET-aMD4dY-PAS100」と表記することがある。）、（ｌ）AET-aMD4dY-PAS200（以下、「AET-aMD4dY-PAS200」と表記することがある。）、（ｍ）AET-aMD4dY-GS15（以下、「AET-aMD4dY-GS15」と表記することがある。）、および（ｎ）AET-aMD4dY-GS22（以下、「AET-aMD4dY-GS22」と表記することがある。）の6種類のアミノ酸配列をそれぞれ設計し、これらタンパク質をコードする塩基配列をC. glutamicumのコドン使用頻度を考慮して設計した。さらに、C. glutamicumによる分泌発現を可能とするよう、それぞれ以下の発現カセットを設計した。

AET-aMD4dY-PAS8は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-aMD4dY-PAS8の融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-aMD4dY-PAS8」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-aMD4dY-PAS8をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：８７、８８に示す。

[0102] CspBss-AET-aMD4dY-PAS8をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc

gtagctatcccagcattcgctgcagagacctgccgccagttcaaccgccgcacccacgaagtgtggaac

ctggattgcggcgctgcaccagccgctccagcaccaggctgccgccagttcaaccgccgcacccacgaa

gtgtggaacctggattgctaa（配列番号：８７）

CspBss-AET-aMD4dY-PAS8のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETCRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPGCRQFNRRTHE

VWNLDC（配列番号：８８）

[0103] AET-aMD4dY-PAS49は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-aMD4dY-PAS49の融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-aMD4dY-PAS49」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-aMD4dY-PAS49をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：８９、９０に示す。

[0104] CspBss-AET-aMD4dY-PAS49をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagacctgtcgtcagttcaaccgtcgcacccacgaagtttggaat
ttggactgtggcgcagcaccagcggcaccagcaccagcagccccagcggcaccagccccagctgcacca
gccgctccagcaccagcagcacccgcagcccccgctcccgcagcccccgccgcaccagcacccgcagca
ccagcagcacccgctccagcaggttgtcgccaattcaaccgccgcacccacgaagtgtggaacctggat
tgctaa（配列番号：８９）

CspBss-AET-aMD4dY-PAS49のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETCRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAAP
AAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAGCRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：９０）

[0105] AET-aMD4dY-PAS100は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-aMD4dY-PAS100の融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-aMD4dY-PAS100」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-aMD4dY-PAS100をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：９１、９２に示す。

[0106] CspBss-AET-aMD4dY-PAS100をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagacctgtcgtcagttcaaccgtcgcacccacgaagtttggaat
ttggactgtggcgcagcaccagcggcaccagcaccagcagccccagcggcaccagccccagctgcacca
gccgctccagcaccagcagccccagcagcccccgctccagcagcacccgcagcaccagctcccgcagcc
ccagcagccccagccccagcagcaccagcagccccagctccagcagccccagctgcaccagctccagcc
gcaccagcagctccagccccagccgctcccgccgccccagcccccgccgcaccagccgcccctgctccc

gccgccccagccgctcccgctccagccgctcctgccggttgccgccagttcaaccgccgcacccacgaa

gtgtggaacctggattgctaa（配列番号：９１）

CspBss-AET-aMD4dY-PAS100のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETCRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAAP

AAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAP

AAPAAPAPAAPAGCRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：９２）

[0107] AET-aMD4dY-PAS200は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-aMD4dY-PAS200の融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-aMD4dY-PAS200」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-aMD4dY-PAS200をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：９３、９４に示す。

[0108] CspBss-AET-aMD4dY-PAS200をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc

gtagctatcccagcattcgctgcagagacctgtcgtcagttcaaccgtcgcacccacgaagtttggaat

ttggactgtggcgcagcaccagcggcaccagcaccagcagccccagcggcaccagccccagctgcacca

gccgctccagcaccagccgcccccgccgcccccgcccctgctgctcctgctgctcccgctcccgctgct

cccgctgcccctgctcctgctgctcccgctgcgccagccccagcagcaccagctgccccagcaccagct

gcaccagccgcaccagctccagcagccccagctgctccagcaccagcagcaccagcagcaccagctcca

gcggcaccagcagcaccagcacctgcggcaccagcggctccagccccagcagcaccagcagcgccagca

ccagcagctccagcagcaccagcaccagcagcaccagcggcaccagccccagctgcaccagccgctcca

gcaccagctgccccagcagctccagccccagccgcacctgccgcacctgcccctgccgctcctgctgcc

cccgctcctgccgctcctgctgcccctgcccctgctgctcctgctgctccagctccagccgcaccagcc

gctccagcaccagctgcaccagcagctccagccccagctgccccagcagctccagcccctggttgccgc

caatttaatcgccgcacccacgaggtctggaatcttgactgctaa（配列番号：９３）

CspBss-AET-aMD4dY-PAS200のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETCRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAAP

AAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAP

AAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAA

PAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPGCRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：９４）

[0109] AET-aMD4dY-GS15は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-aMD4dY-GS15の融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-aMD4dY-GS15」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-aMD4dY-GS15をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：９５、９６に示す。

[0110] CspBss-AET-aMD4dY-GS15をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagacctgccgccagttcaaccgccgcacccacgaagtgtggaac
ctggattgcggcggcggcggctccggcggcggcggctccggcggcggcggctccggctgccgccag
ttcaaccgccgcacccacgaagtgtggaacctggattgctaa（配列番号：９５）

CspBss-AET-aMD4dY-GS15のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETCRQFNRRTHEVWNLDCGGGGGSGGGGSGGGGSGCRQ
FNRRTHEVWNLDC（配列番号：９６）

[0111] AET-aMD4dY-GS22は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-aMD4dY-GS22の融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-aMD4dY-GS22」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-aMD4dY-GS22をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：９７、９８に示す。

[0112] CspBss-AET-aMD4dY-GS22をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagacctgccgccagttcaaccgccgcacccacgaagtgtggaac
ctggattgcggcggcggcggctccggcggcggcggttctggcggtggcggttctggcggcggcggt
tctggcggcggttgtcgtcagttcaatcgtcgcacccacgaagtctggaatctcgactgctaa（配列番号：９７）

CspBss-AET-aMD4dY-GS22のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETCRQFNRRTHEVWNLDCGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG

SGGGCRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：９８）

[0113] CspBss-AET-aMD4dY-PAS8、CspBss-AET-aMD4dY-PAS49、CspBss-AET-aMD4dY-PAS100、CspBss-AET-aMD4dY-PAS200、CspBss-AET-aMD4dY-GS15、およびCspBss-AET-aMD4dY-GS22に記載の塩基配列の上流にC. glutamicum ATCC13869株由来のcspB遺伝子のプロモーターを繋げ、さらに5’-側にKpnIサイト、3’-側にBamHIサイトを付加した、各HGF-PASダイマーペプチドリンカー改変体の発現カセットを設計し、全合成した。全合成したDNA断片（HGF-PASダイマーペプチドリンカー改変体の発現カセット）を、特開平9-322774に記載のpPK4のKpnI-BamHI部位に挿入することによって、CspBシグナル配列を利用した各HGF-PASダイマーペプチドリンカー改変体の分泌発現プラスミドであるpPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS8、pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS49、pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS100、pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS200、pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-GS15、およびpPK4_CspBss-AET-aMD4dY-GS22をそれぞれ構築した。挿入断片の塩基配列決定の結果、それぞれ設計通りのHGF-PASダイマーペプチドリンカー改変体の発現カセットが構築されていることを確認した。塩基配列の決定はBigDye（登録商標）Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）と3500xL Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を用いて行った。

また、上記と同様に、pPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4dY-PEG11を構築し、その構築を確認した。AET-PAS-aMD4dY-PEG11は、実施例４に記載のものであり、22アミノ酸からなるPASリンカーを有する。

[0114] （１４－５）C. glutamicumにおける各HGF-PASダイマーペプチドの分泌発現

上記で構築したpPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS8、pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS49、pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS100、pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS200、pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-GS15、およびpPK4_CspBss-AET-aMD4dY-GS22を用いて、WO2016/171224に記載のC. glutamicum YDK010::phoS(W302C)株を形質転換し、YDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS8株、YDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS49株、YDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS100株、YDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS200

株、YDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-GS15株、およびYDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-GS22株を得た。

得られた各形質転換体を、25 mg/Lのカナマイシンを含むMMTG液体培地（グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3 g、硫酸アンモニウム 30 g、リン酸二水素カリウム 1.5 g、硫酸鉄七水和物 0.03 g、硫酸マンガン五水和物 0.03 g、チアミン塩酸塩 0.45 mg、ビオチン 0.45 mg、DL-メチオニン 0.15 g、大豆塩酸加水分解液（全窒素量 0.2 g）、炭酸カルシウム 50 g、水で1 Lにしてp H7.0に調整）でそれぞれ30℃、72時間培養した。

培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清6.5 μLをNuPAGE（登録商標）12% Bis-Tirs Gel（Thermo Fisher Scientific）を用いて還元SDS-PAGEに供してからQuick-CBB（Wako）にて染色を行った。その結果、YDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS8株の培養上清中にAET-aMD4dY-PAS8と推定されるタンパク質バンド（図２０、レーン４）、YDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS49株の培養上清中にAET-aMD4dY-PAS49と推定されるタンパク質バンド（図２０、レーン６）、YDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS100株の培養上清中にAET-aMD4dY-PAS100と推定されるタンパク質バンド（図２０、レーン７）、YDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS200株の培養上清中にAET-aMD4dY-PAS200と推定されるタンパク質バンド（図２０、レーン８）、YDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-GS15株の培養上清中にAET-aMD4dY-GS15と推定されるタンパク質バンド（図２０、レーン２）、およびYDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-GS22株の培養上清中にAET-aMD4dY-GS22と推定されるタンパク質バンド（図２０、レーン３）がそれぞれ検出された。

また、上記と同様の方法で得たYDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4dY-PEG11株を、上記と同様に培養し、その培養上清中にAET-PAS-aMD4dY-PEG11（以下、「AET-aMD4dY-PAS22」とも称される。）と推定されるタンパク質バンド（図２０、レーン５）が検出された。

リンカーの長さが同じ22残基どうしで比較すると、AET-aMD4dY-GS22（図２

０、レーン３）よりもAET-aMD4dY-PAS22（図２０、レーン５：AET-PAS-aMD4dY-PEG11と同じ分子）の方が高分泌を示し、即ち、GSリンカーよりもPASリンカーを用いた方が高分泌であった。

[0115] 実施例１５：HGF-PASダイマーペプチドの分子量分析

実施例１４における培養後の、各HGF-PASダイマーペプチドの菌体ろ過液について、LC-MS (Waters, ACQUITY UPLC H-Class/SQD2) を用いて分子量の測定を行った。分析条件は表２に示した。

[0116]

[表2]

LC set up				
System		ACQUITYUPLC H-Class /SQD2		
Column		TMC-Triart C8 50 x 2.0 mmI.D. 1.9 um, 12nm(TO12SP9-0502PT)		
Solvent	A	0.1% TFA		
	B	0.1% TFA, 80% Acetonitrile		
Flow rate		1.0 mL/min		
Column temp.		40 ℃		
Detection		220 nm		
Sample Vol.		10 uL		
Gradient program		Time (min)	%A	%B
		0	100	0
		50	50	50
		53	0	100
		53.1	100	0
		56	100	0
		56.1	0	100
		59	0	100
		59.1	100	0
		65	100	0
MS spectrometer set up				
Ion mode		ESI positive		
Range		800-2500 m/z		
Scan time		0.4 amu/sec		
Capillary Voltage		2.0kV		
Cone voltage		10V, 20V, 40V		
Desolvation temp		500 ℃		
Desolvation Gas Flow		1000 L/hr		
Cone Gas Flow		50 L/hr		
Software		Deconvolution is performed using "MassLynx"		

[0117] 図２１～２６に示すとおり、分子内で2つのジスルフィド結合を形成している酸化型の各ダイマーペプチドの分子量の理論値にほぼ同一の値が得られた。このことから、2つのジスルフィド結合を含む正しいアミノ酸配列のペプチドを発現できたことが確認された。

[0118] 実施例１６：HGF-PASダイマーペプチドリンカー改変体の活性評価

HGF-PASダイマーペプチドリンカー改変体のMet活性化能はルシフェラーゼ

アッセイによって評価した。Opti-MEM培地（Thermo Fisher Scientific社）25 μLに対し、0.6 μLのAttractene Transfection Reagent（QIAGEN社）を添加し、室温で5 分インキュベートを行った。上記混合溶液に対し、Opti-MEM 25 μLと1 μLのSRE reporter vector（QIAGEN社）の混合溶液を加え、室温で20分インキュベートを行った。この混合溶液を96-well plateに添加し、その上から40,000 cell/wellのHEK293E細胞を播種し、37 ℃、5% CO_2インキュベータ内で終夜インキュベートを行った。トランスフェクション後、培養上清を全て除去し、0.5% FBS（Thermo Fisher Scientific社），1% 非必須アミノ酸溶液（Thermo Fisher Scientific社）およびペニシリン－ストレプトマイシン（ナカライテスク社）を含むOpti-MEM培地（評価基礎培地）を100 μL添加し、37 ℃で4時間培養することで、細胞を飢餓状態にした。

評価基礎培地に、0-100 ng/mLのHGFを加えるか、またはAET-aMD4dY-PAS8, AET-aMD4dY-PAS22（AET-PAS-aMD4dY-PEG11と同じ分子），AET-aMD4dY-PAS49, AET-aMD4dY-PAS100, AET-aMD4dY-PAS200, AET-aMD4dY-GS15, もしくはAET-aMD4dY-GS22を含む培養上清を当該培地に対して所定の倍率で希釈されるように加え、その評価基礎培地を細胞に100 μL添加した。37 ℃、5% CO_2インキュベータ内で終夜培養することで細胞への刺激を行った。

シグナル強度の検出にはDual-Luciferase Reporter Assay System (Promega社）を使用した。100 μLの培地上清を除去し、Glo reagentを50 μL添加し、室温で10分細胞を溶解した。細胞の溶解液から発せられるFirefly luciferaseの発光をプレートリーダーで検出することで、HGF-Erk-SRE経路の活性化を定量した。続いて、50 μLのGlo & Stop reagent溶液を添加し、10分後に内部標準であるRenilla luciferaseの発光を検出し、細胞数の定量を行った。SRE activity = (Firefly luciferaseの発光強度)/(Renilla luciferaseの発光強度)として、各サンプルのシグナル活性を定量した。評価化合物を加えていないサンプルに対する相対的なシグナル活性値を求め、相対的受容体活性（Relative reporter activity）とした。

図２７に示す通り、PASリンカー長の異なるHGF-PASダイマーペプチドは全

てHGFシグナルを活性化することが明らかになった。PASリンカーの長さが22アミノ酸の場合に最も高い効率を発揮し、下記表３に示す通り100アミノ酸を超えると最大活性（EC50）が半減することが明らかになった。また、図２８に示すように、15アミノ酸および22アミノ酸のGSリンカーで二量化しても活性が得られたが、その最大活性（EC50）は下記表３に示す通りPASリンカーに比べて半分以下であり、PASリンカーを用いることで高い活性を有するダイマーペプチドが作製できることが明らかになった。

[0119] [表3]

ペプチド	Emax（%）
AET-aMD4dY-PAS22	100.0
AET-aMD4dY-PAS8	56.4
AET-aMD4dY-PAS49	82.8
AET-aMD4dY-PAS100	47.2
AET-aMD4dY-PAS200	20.4
AET-aMD4dY-GS15	45.8
AET-aMD4dY-GS22	32.3

[0120] 実施例１７：安定化HGF-PASダイマーペプチドの設計およびC. glutamicumにおけるその分泌発現

[0121] （１７－１）設計の概要

安定性を高めたHGF-PASペプチドは、以下のように設計した。ペプチドやタンパク質の安定性を高める手法として、長鎖のPAS配列を付加する方法が報告されている（特表2013-531480及び特表2010-531139）。安定性を高めたHGF-PASペプチドとして、AET-aMD4dY-PAS22（AET-PAS-aMD4dY-PEG11と同じ分子）のC末端に200アミノ酸からなるPAS配列（PAS200）を結合させたペプチドを設計した。すなわち「第一のaMD4dY環状ペプチド」－「PASリンカー」－「第二のaMD4dY環状ペプチド」－「長鎖PAS配列（PAS200）」となるようペプチド配列を設計した。

[0122] （１７－２）安定化HGF-PASダイマーペプチドの調製

調製した安定化HGF-PASダイマーペプチドは以下のとおりである。

（ｏ）AET-aMD4dY-PAS22-PAS200

AETCRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPGCRQFNRRTHEVWNLDCAAPAAPAPAA
PAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPA
PAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPA
APAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAP（配列番号：９９
）

[0123]（１７－３）安定化HGF-PASダイマーペプチドの発現

Corynex（登録商標）を用いて安定化HGF-PASダイマーペプチドの発現検討を行った。以下、Corynex（登録商標）による発現検討の実施例を記載する。

[0124]（１７－４）CspBシグナル配列を利用したAET-aMD4dY-PAS22-PAS200分泌発現プラスミドの構築

安定化HGF-PASダイマーペプチドとして、上記（ｏ）AET-aMD4dY-PAS22-PAS200（以下、「AET-aMD4dY-PAS22-PAS200」と表記することがある。）のアミノ酸配列を設計し、このタンパク質をコードする塩基配列をC. glutamicumのコドン使用頻度を考慮して設計した。さらに、C. glutamicumによる分泌発現を可能とするよう、以下の発現カセットを設計した。

AET-aMD4dY-PAS22-PAS200は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-aMD4dY-PAS22-PAS200の融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-aMD4dY-PAS22-PAS200」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-aMD4dY-PAS22-PAS200をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１００、１０１に示す。

[0125] CspBss-AET-aMD4dY-PAS22-PAS200をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagacctgccgtcagttcaaccgccgtacccacgaagtttggaat
ctcgactgtggtgccgcccctgccgctcctgcccctgccgccccagccgctccagcaccagccgctcca
gcagccccaggctgccgccagttcaaccgccgcacccacgaagtgtggaacctggattgcgcagctcca
gcagcccctgcccccgccgccccagccgcccctgcccccgccgcccccgccgcacccgcccctgccgcc
cccgccgcccccgcccctgctgctcctgctgctcccgctcccgctgctcccgctgcccctgctcctgct

gctcccgctgcgccagccccagcagcaccagctgccccagcaccagctgcaccagccgcaccagctcca
gcagccccagctgctccagcaccagcagcaccagcagcaccagctccagcggcaccagcagcaccagca
cctgcggcaccagcggctccagccccagcagcaccagcagcgccagcaccagcagctccagcagcacca
gcaccagcagcaccagcggcaccagccccagctgcaccagccgctccagcaccagctgccccagcagct
ccagccccagctgcccctgctgccccgctcctgccgctcccgctgcccctgcccctgctgctcctgct
gctcccgctcctgccgctcccgctgcgccagctccagcagccccagctgcaccagccccagccgcacca
gccgccccagcccccgcagcacccgcagcaccagccccataa（配列番号：１００）

CspBss-AET-aMD4dY-PAS22-PAS200のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETCRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAAP
AAPGCRQFNRRTHEVWNLDCAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPA
APAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAP
APAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAP
AAPAPAAPAAPAP（配列番号：１０１）

[0126] CspBss-AET-aMD4dY-PAS22-PAS200に記載の塩基配列の上流にC. glutamicum ATCC13869株由来のcspB遺伝子のプロモーターを繋げ、さらに5’-側にKpnIサイト、3’-側にBamHIサイトを付加した、安定化HGF-PASダイマーペプチドの発現カセットを設計し、全合成した。全合成したDNA断片（安定化HGF-PASダイマーペプチドの発現カセット）を、特開平9-322774に記載のpPK4のKpnI-BamHI部位に挿入することによって、CspBシグナル配列を利用した安定化HGF-PASダイマーペプチドの分泌発現プラスミドであるpPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS22-PAS200を構築した。挿入断片の塩基配列決定の結果、設計通りの安定化HGF-PASダイマーペプチドの発現カセットが構築されていることを確認した。塩基配列の決定はBigDye（登録商標）Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）と3500xL Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を用いて行った。

[0127] （１７－５）C. glutamicumにおける安定化HGF-PASダイマーペプチドの分泌発現

上記で構築したpPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS22-PAS200を用いてWO2016/171

224に記載のC. glutamicum YDK010::phoS(W302C)株を形質転換し、YDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS22-PAS200株を得た。

得られた各形質転換体を、25 mg/Lのカナマイシンを含むMMTG液体培地（グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3 g、硫酸アンモニウム 30 g、リン酸二水素カリウム 1.5 g、硫酸鉄七水和物 0.03 g、硫酸マンガン五水和物 0.03 g、チアミン塩酸塩 0.45 mg、ビオチン 0.45 mg、DL-メチオニン 0.15 g、大豆塩酸加水分解液（全窒素量 0.2 g）、炭酸カルシウム 50 g、水で1 Lにしてp H7.0に調整）でそれぞれ30℃、72時間培養した。

培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清6.5 μLをNuPAGE（登録商標）4-12% Bis-Tirs Gel (Thermo Fisher Scientific) を用いて還元SDS-PAGEに供してからQuick-CBB (Wako) にて染色を行った。その結果、YDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS22-PAS200株の培養上清中にAET-aMD4dY-PAS22-PAS200と推定されるタンパク質バンドが検出された（図２９、レーン２～５）。

[0128] 実施例１８：安定化HGF-PASダイマーペプチドの分子量分析

実施例１７における培養後の、安定化HGF-PASダイマーペプチドの菌体ろ過液について、LC-MS (Waters, ACQUITY UPLC/SQD2) を用いて分子量の測定を行った。分析条件は表２に記載のとおりである。図３０に示すとおり、分子内で2つのジスルフィド結合を形成している酸化型の各ダイマーペプチドの分子量の理論値にほぼ同一の値が得られた。このことから、2つのジスルフィド結合を含む正しいアミノ酸配列のペプチドを発現できたことが確認された。

[0129] 実施例１９：安定化HGF-PASダイマーペプチドの活性評価

安定化HGF-PASダイマーペプチドのMet活性化能をルシフェラーゼアッセイによって評価した。Opti-MEM培地 (Thermo Fisher Scientific社) 25 μLに対し、0.6 μLのAttractene Transfection Reagent (QIAGEN社) を添加し、室温で5分インキュベートを行った。上記混合溶液に対し、Opti-MEM 25 μLと1 μLのSRE reporter vector (QIAGEN社) の混合溶液を加え、室温で20分インキュベートを行った。この混合溶液を96-well plateに添加し、その上か

ら40,000 cell/wellのHEK293E細胞を播種し、37 ℃、5% CO_2インキュベータ内で終夜インキュベートを行った。トランスフェクション後、培養上清を全て除去し、0.5% FBS（Thermo Fisher Scientific社）、1% 非必須アミノ酸溶液（Thermo Fisher Scientific社）およびペニシリン－ストレプトマイシン（ナカライテスク社）を含むOpti-MEM培地（評価基礎培地）を100 μL添加し、37 ℃で4時間培養することで、細胞を飢餓状態にした。

評価基礎培地に、0-100 ng/mLのHGFを加えるか、またはAET-aMD4dY-PAS22-PAS200を含む培養上清を当該培地に対して所定の倍率で希釈されるように加え、その評価基礎培地を細胞に100 μL添加した。37 ℃、5% CO_2インキュベータ内で終夜培養することで細胞への刺激を行った。

シグナル強度の検出にはDual-Luciferase Reporter Assay System (Promega社）を使用した。100 μLの培地上清を除去し、Glo reagentを50 μL添加し、室温で10分細胞を溶解した。細胞の溶解液から発せられるFirefly luciferaseの発光をプレートリーダーで検出することで、HGF-Erk-SRE経路の活性化を定量した。続いて、50 μLのGlo & Stop reagent溶液を添加し、10分後に内部標準であるRenilla luciferaseの発光を検出し、細胞数の定量を行った。SRE activity = (Firefly luciferaseの発光強度)/(Renilla luciferaseの発光強度)として、各サンプルのシグナル活性を定量した。評価化合物を加えていないサンプルに対する相対的なシグナル活性値を求め、相対的受容体活性（Relative reporter activity）とした。

図３１に示す通り、安定化HGF-PASダイマーペプチドはシグナル活性化能を有すること、また最大活性は100 ng/mL HGFと同程度であることが明らかになった。

[0130] 実施例２０：EPO-PASダイマーペプチドの設計およびC. glutamicumにおけるその分泌発現

（２０－１）設計の概要

エリスロポエチン模倣ペプチドとしてPeginesatideが報告されている。Peginesatideはエリスロポエチン受容体結合ペプチドのC末端にリジンを付加し

、ε-アミノ基同士を長鎖PEGで結合させたジカルボン酸リンカーで結合させた構造を有する。しかし、Peginesatideを、一つのポリペプチド鎖としてC. glutamicumで発現することは、以下の理由から行うことができない。

（１）Peginesatideには非天然アミノ酸が含まれており、非天然アミノ酸を含むペプチドをC. glutamicumで発現させることができない。

（２）ジカルボン酸リンカーを含むペプチドはC. glutamicumで発現することができない。

（３）ダイマー化は２分子の環状ペプチドのC末端をリジンのε-アミノ基で結合することで達成されているが、C末端同士が結合した構造および、リジンのε-アミノ基と別のアミノ酸がアミド結合を形成する構造は、C. glutamicumで発現することができない。

そのため、次のように分子に変換を加えることで、発現できる形にデザインした。上記（１）に関しては非天然アミノ酸を含まないエリスロポエチン受容体結合環状ペプチド（US5773569A）を用いることで発現することが可能である。上記（２）に関しては、ペプチド性リンカーを用いることで発現することが可能である。上記（３）に関しては、環状ペプチドのC末端同士ではなく、一方の環状ペプチドのN末端と他方のペプチドのC末端をPAS配列を用いて結合させることで対応した。すなわち、「第一のエリスロポエチン受容体結合環状ペプチド」－「PASリンカー」－「第二のエリスロポエチン受容体結合環状ペプチド」となるようペプチド配列を設計することで対応した。すなわち、第一のエリスロポエチン受容体結合環状ペプチドのC末端とPASリンカーのN末端が、第二のエリスロポエチン受容体結合環状ペプチドのN末端とPASリンカーのC末端がそれぞれアミド結合で結合されており、一本のポリペプチド鎖として発現可能である。

[0131] （２０－２）EPO-PASダイマーペプチドの調製

調製したEPO-PASダイマーペプチドは以下のとおりである。

（ｐ）EPO-PAS8

GGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPGGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：１０２）

（ｑ）EPO-PAS22

GGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPGGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：１０３）

（ｒ）AET-EPO-PAS8

AETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPGGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：１０４）

（ｓ）AET-EPO-PAS22

AETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPGGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：１０５）

[0132] （２０－３）EPO-PASダイマーペプチドの発現

Corynex（登録商標）を用いてこれらのEPO-PASダイマーペプチドの発現検討を行った。以下、Corynex（登録商標）による発現検討の実施例を記載する。

[0133] （２０－４）CspAシグナル配列を利用したEPO-PAS8およびEPO-PAS22の各分泌発現プラスミドの構築

EPO-PASダイマーペプチドとして、上記（ｐ）EPO-PAS8（以下、「EPO-PAS8」と表記することがある。）および（ｑ）EPO-PAS22（以下、「EPO-PAS22」と表記することがある。）の2種類のアミノ酸配列をそれぞれ設計し、これらタンパク質をコードする塩基配列をC. glutamicumのコドン使用頻度を考慮して設計した。さらに、C. glutamicumによる分泌発現を可能とするよう、それぞれ以下の発現カセットを設計した。

EPO-PAS8は、C. ammoniagenes ATCC6872株由来のCspAのシグナルペプチド25アミノ酸残基とEPO-PAS8の融合タンパク質（以下、「CspAss-EPO-PAS8」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspAss-EPO-PAS8をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１０６、１０７に示す。

[0134] CspAss-EPO-PAS8をコードする塩基配列

atgaaacgcatgaaatcgctggctgcggcgctcaccgtcgctggggccatgctggccgcacctgtggca

acggcaggtggcctttacgcttgtcacatgggtccaatgacctgggtttgtcagcccctccgtggtgcc
gctcctgccgccccgctcctggtggcctgtacgcatgccatatgggtccaatgacttgggtgtgccag
ccactccgcggctaa（配列番号：１０６）

CspAss-EPO-PAS8のアミノ酸配列

MKRMKSLAAALTVAGAMLAAPVATAGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPGGLYACHMGPMTWVCQ
PLRG（配列番号：１０７）

[0135] EPO-PAS22は、C. ammoniagenes ATCC6872株由来のCspAのシグナルペプチド25アミノ酸残基とEPO-PAS22の融合タンパク質（以下、「CspAss-EPO-PAS22」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspAss-EPO-PAS22をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１０８、１０９に示す。

[0136] CspAss-EPO-PAS22をコードする塩基配列

atgaaacgcatgaaatcgctggctgcggcgctcaccgtcgctggggccatgctggccgcacctgtggca
acggcaggcggcctttacgcttgtcacatgggtccaatgacctgggtctgtcaacctctccgtggtgca
gccccggcagcccccgctccagccgcaccagcagccccagccccagctgcaccagccgctccaggcggc
ctctacgcctgccacatgggtcctatgacctgggtgtgccaaccacttcgcggctaa（配列番号：
１０８）

CspAss-EPO-PAS22のアミノ酸配列

MKRMKSLAAALTVAGAMLAAPVATAGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPGG
LYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：１０９）

[0137] CspAss-EPO-PAS8およびCspAss-EPO-PAS22に記載の塩基配列の上流にC. glutamicum ATCC13869株由来のcspB遺伝子のプロモーターを繋げ、さらに5’-側にKpnIサイト、3’-側にBamHIサイトを付加した、各EPO-PASダイマーペプチドの発現カセットを設計し、全合成した。全合成したDNA断片（EPO-PASダイマーペプチドの発現カセット）を、特開平9-322774に記載のpPK4のKpnI-BamHI部位に挿入することによって、CspAシグナル配列を利用した各EPO-PASダイマーペプチドの分泌発現プラスミドであるpPK4_CspAss-EPO-PAS8およびpPK4_CspAss-EPO-PAS22をそれぞれ構築した。挿入断片の塩基配列決定の結果、そ

れぞれ設計通りのEPO-PASダイマーペプチドの発現カセットが構築されていることを確認した。塩基配列の決定はBigDye（登録商標）Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）と3500xL Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を用いて行った。

[0138] （２０－５）CspBシグナル配列を利用したAET-EPO-PAS8およびAET-EPO-PAS22の各分泌発現プラスミドの構築

EPO-PASダイマーペプチドとして、上記（ｒ）AET-EPO-PAS8（以下、「AET-EPO-PAS8」と表記することがある。）および（ｓ）AET-EPO-PAS22（以下、「AET-EPO-PAS22」と表記することがある。）の2種類のアミノ酸配列をそれぞれ設計し、これらタンパク質をコードする塩基配列をC. glutamicumのコドン使用頻度を考慮して設計した。さらに、C. glutamicumによる分泌発現を可能とするよう、それぞれ以下の発現カセットを設計した。

AET-EPO-PAS8は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-EPO-PAS8の融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-EPO-PAS8」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-EPO-PAS8をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１１０、１１１に示す。

[0139] CspBss-AET-EPO-PAS8をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagaccggtggcctttacgcttgtcacatgggtccaatgacctgg
gtttgtcagcccctccgtggtgccgctcctgccgccccgctcctggtggcctgtacgcatgccatatg
ggtccaatgacttgggtgtgccagccactccgcggctaa（配列番号：１１０）

CspBss-AET-EPO-PAS8のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPGGLYACHM
GPMTWVCQPLRG（配列番号：１１１）

[0140] AET-EPO-PAS22は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-EPO-PAS22の融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-EPO-PAS22」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-EP

O-PAS22をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１１２、１１３に示す。

[0141] CspBss-AET-EPO-PAS22をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagaccggcggcctttacgcttgtcacatgggtccaatgacctgg
gtctgtcaacctctccgtggtgcagccccggcagcccccgctccagccgcaccagcagccccagcccca
gctgcaccagccgctccaggcggcctctacgcctgccacatgggtcctatgacctgggtgtgccaacca
cttcgcggctaa（配列番号：１１２）

CspBss-AET-EPO-PAS22のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPAAPAAPAP
AAPAAPGGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：１１３）

[0142] CspBss-AET-EPO-PAS8およびCspBss-AET-EPO-PAS22に記載の塩基配列の上流にC. glutamicum ATCC13869株由来のcspB遺伝子のプロモーターを繋げ、さらに5’-側にKpnIサイト、3’-側にBamHIサイトを付加した、各EPO-PASダイマーペプチドの発現カセットを設計し、全合成した。全合成したDNA断片（EPO-PASダイマーペプチドの発現カセット）を、特開平9-322774に記載のpPK4のKpnI-BamHI部位に挿入することによって、CspBシグナル配列を利用した各EPO-PASダイマーペプチドの分泌発現プラスミドであるpPK4_CspBss-AET-EPO-PAS8およびpPK4_CspBss-AET-EPO-PAS22をそれぞれ構築した。挿入断片の塩基配列決定の結果、それぞれ設計通りのEPO-PASダイマーペプチドの発現カセットが構築されていることを確認した。塩基配列の決定はBigDye（登録商標）Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) と3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。

[0143] （２０－６）C. glutamicumにおける各EPO-PASダイマーペプチドの分泌発現

上記で構築したpPK4_CspAss-EPO-PAS8、pPK4_CspAss-EPO-PAS22、pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS8、およびpPK4_CspBss-AET-EPO-PAS22を用いて、WO2016/171224に記載のC. glutamicum YDK0107株を形質転換し、YDK0107/pPK4_CspAss-EPO-PAS8株、YDK0107/pPK4_CspAss-EPO-PAS22株、YDK0107/pPK4_CspBss-AET-E

PO-PAS8株、およびYDK0107/pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS22株を得た。

得られた各形質転換体を、25 mg/Lのカナマイシンを含むMMTG液体培地（グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3 g、硫酸アンモニウム 30 g、リン酸二水素カリウム 1.5 g、硫酸鉄七水和物 0.03 g、硫酸マンガン五水和物 0.03 g、チアミン塩酸塩 0.45 mg、ビオチン 0.45 mg、DL-メチオニン 0.15 g、大豆塩酸加水分解液（全窒素量 0.2 g）、炭酸カルシウム 50 g、水で1 Lにしてp H7.0に調整）でそれぞれ30℃、72時間培養した。

培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清6.5 μLをNuPAGE（登録商標）12% Bis-Tirs Gel（Thermo Fisher Scientific）を用いて還元SDS-PAGEに供してからQuick-CBB（Wako）にて染色を行った。その結果、YDK0107/pPK4_CspAss-EPO-PAS8株の培養上清中にEPO-PAS8と推定されるタンパク質バンド（図３２、レーン２～５）、YDK0107/pPK4_CspAss-EPO-PAS22株の培養上清中にEPO-PAS22と推定されるタンパク質バンド（図３２、レーン６～９）、YDK0107/pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS8株の培養上清中にAET-EPO-PAS8と推定されるタンパク質バンド（図３２、レーン１０～１３）、およびYDK0107/pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS22株の培養上清中にAET-EPO-PAS22と推定されるタンパク質バンド（図３２、レーン１４～１７）がそれぞれ検出された。

[0144] 実施例２１：EPO-PASダイマーペプチドの分子量分析

実施例２０における培養後の、AET-EPO-PAS8とAET-EPO-PAS22の菌体ろ過液について、LC-MS（Waters, LC-MS（Waters, ACQUITY UPLC/SQD2）を用いて分子量の測定を行った。分析条件は表２に記載のとおりである。図３３及び３４に示すとおり、分子内で2つのジスルフィド結合を形成している酸化型の各ダイマーペプチドの分子量の理論値にほぼ同一の値が得られた。このことから、2つのジスルフィド結合を含む正しいアミノ酸配列のペプチドを発現できたことが確認された。

[0145] 実施例２２：EPO-PASダイマーペプチドの活性評価

EPO-PASダイマーペプチドのEpoR活性化能はPathHunter（登録商標） eXpress EpoR-JAK2 Functional Assay Kit（DiscoverX社）を用いて評価した。

96-wellプレートにPathHunter（登録商標） eXpress EpoR-JAK2 Functional Assay Kitに含まれるEPO活性評価用細胞を播種し、24時間37 ℃、5% CO_2下で培養を行った。細胞に対し、860 pg/L - 900 μg/Lのリコンビナントヒトエリスロポエチン(rhEPO, Peprotech社)、または所定の濃度に希釈されたAET-EPO-PAS8もしくはAET-EPO-PAS22を含む培養上清（培養は実施例２０に記載のとおり）、またはモノマーペプチドであるEMP35（GGLYACHMGPMTWVCQPLRG, ジェンスクリプトジャパン株式会社で合成）を添加した。陰対照としては、EPO-PASダイマーペプチド発現用遺伝子を含まないベクターを用いること以外は実施例２０に記載のとおり培養を行って得た培養上清（図３２、レーン１８）を、AET-EPO-PAS8もしくはAET-EPO-PAS22を含む培養上清と同様の倍率で希釈したものを添加した。3時間室温で刺激した細胞に対し、調製したSubstrate Reagentを添加し、60分インキュベートした。化学発光強度をNivoプレートリーダー（Perkin Elmer社）で定量した。

図３５に示すように、AET-EPO-PAS8およびAET-EPO-PAS22は濃度依存的にEpoRを活性化することが明らかになった。その最大活性化能はrhEPOとほぼ同等であった。また、下記表４に示すように、EC50値はrhEPOが1.1×10^{-6} g/Lであるのに対し、AET-EPO-PAS8は1.9×10^{-7} g/L, AET-EPO-PAS22は3.4×10^{-7} g/Lと高い活性を有することが明らかになった。また、モノマーペプチドであるEMP35は1.1×10^{-4} g/LとEPO-PASダイマーペプチドに比して1000倍程度低い活性を示し（図３６、表４）、二量化によってより高いアゴニスト活性が得られることが明らかになった。

[0146] [表4]

ペプチド	EC50 (g/L)
rhEPO	1.1×10^{-6}
AET-EPO-PAS8	1.9×10^{-7}
AET-EPO-PAS22	3.4×10^{-7}
EMP35	1.1×10^{-4}

[0147] 実施例２３：TPO-PASダイマーペプチドの設計およびC. glutamicumにおける

その分泌発現

（２３－１）設計の概要

トロンボポエチン受容体であるc-Mplに結合するペプチドダイマーは、以下の理由からC. glutamicumで発現することができない。具体的には、S. E. Cwirla, et al. Science, 276, 1696-1699, 1997で報告されている直鎖状c-Mpl結合ペプチドAF12505をリジンのα-およびε-アミノ基によりダイマー化したペプチドダイマー分子（AF13948）を、一つのポリペプチド鎖としてC. glutamicumで発現することは、以下の理由から行うことができない。

（１）ダイマー化は直鎖状ペプチドAF12505のC末端同士をリジンのα-およびε-アミノ基を介して結合することで達成されており、C. glutamicumで発現することができない。（２）リジンのα-アミノ基に結合したAF12505のC末端には非タンパク質性アミノ酸のβ-アラニンが結合しており、非タンパク質性アミノ酸を含むペプチドはC. glutamicumで発現することができない。そのため、次のように分子に変換を加えることで発現できる形にデザインした。リジンおよびβ-アラニンの代わりにPAS配列を用いること、さらに一本のポリペプチド鎖として発現できるように「第一のAF12505」－「PASリンカー」－「第二のAF12505」となるようペプチド配列を設計することで対応した。すなわち、第一のAF12505のC末端とPASリンカーのN末端が、第二のAF12505のN末端とPASリンカーのC末端がそれぞれアミド結合で結合されており、一本のポリペプチド鎖として発現可能である。

また、WO9640750で報告されている、環状c-Mpl結合ペプチドAF12285のC末端にビオチンを付加し、ストレプトアビジンで多量化したペプチドを、一つのポリペプチド鎖としてC. glutamicumで発現することは、以下の理由から行うことができない。

（１）環状ペプチドAF12285のC末端にはリジンのε-アミノ基を介してビオチンが修飾されている。ビオチンを含むペプチドはC. glutamicumで発現することができない。

（２）ビオチン化環状ペプチドはストレプトアビジンで多量化されている。

ペプチドと同時にストレプトアビジンを発現することはC. glutamicumではできない。そのため、次のように分子に変換を加えることで、発現できる形にデザインした。ビオチン-ストレプトアビジンによる多量化の代わりに、PAS配列を用いることで多量化を行い、さらに一本のポリペプチド鎖として発現できるように「第一のAF12285」－「PASリンカー」－「第二のAF12285」となるようペプチド配列を設計することで対応した。すなわち、第一のAF12505のC末端とPASリンカーのN末端が、第二のAF12505のN末端とPASリンカーのC末端がそれぞれアミド結合で結合されており、一本のポリペプチド鎖として発現可能である。

[0148] （２３－２）TPO-PASダイマーペプチドの調製

調製したTPO-PASダイマーペプチドは以下のとおりである。

（ｔ）TPO2-PAS8

GGCADGPTLREWISFCGGAAPAAPAPGGCADGPTLREWISFCGG（配列番号：１１４）

（ｕ）AET-TPO1-PAS8

AETIEGPTLRQWLAARAAAPAAPAPIEGPTLRQWLAARA（配列番号：１１５）

（ｖ）AET-TPO2-PAS8

AETGGCADGPTLREWISFCGGAAPAAPAPGGCADGPTLREWISFCGG（配列番号：１１６）

[0149] （２３－３）TPO-PASダイマーペプチドの発現

Corynex（登録商標）を用いてこれらのTPO-PASダイマーペプチドの発現検討を行った。以下、Corynex（登録商標）による発現検討の実施例を記載する。

[0150] （２３－４）CspAシグナル配列を利用したTPO2-PAS8の分泌発現プラスミドの構築

TPO-PASダイマーペプチドとして、上記（ｔ）TPO2-PAS8（以下、「TPO2-PAS8」と表記することがある。）のアミノ酸配列を設計し、このタンパク質をコードする塩基配列をC. glutamicumのコドン使用頻度を考慮して設計した。さらに、C. glutamicumによる分泌発現を可能とするよう、以下の発現カセットを設計した。

TPO2-PAS8は、C. ammoniagenes ATCC6872株由来のCspAのシグナルペプチド25アミノ酸残基とTPO2-PAS8の融合タンパク質（以下、「CspAss-TPO2-PAS8」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspAss-TPO2-PAS8をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１１７、１１８に示す。

[0151] CspAss-TPO2-PAS8をコードする塩基配列

atgaaacgcatgaaatcgctggctgcggcgctcaccgtcgctggggccatgctggccgcacctgtggca

acggcaggtggttgtgctgatggtcctaccttgcgtgaatggatttccttctgcggcggcgctgctccg

gctgcccctgcccctggcggttgcgcagatggcccaaccctgcgcgaatggatctccttctgcggcggc

taa（配列番号：１１７）

CspAss-TPO2-PAS8のアミノ酸配列

MKRMKSLAAALTVAGAMLAAPVATAGGCADGPTLREWISFCGGAAPAAPAPGGCADGPTLREWISFCGG

（配列番号：１１８）

[0152] CspAss-TPO2-PAS8に記載の塩基配列の上流にC. glutamicum ATCC13869株由来のcspB遺伝子のプロモーターを繋げ、さらに5’-側にKpnIサイト、3’-側にBamHIサイトを付加した、TPO-PASダイマーペプチドの発現カセットを設計し、全合成した。全合成したDNA断片（TPO-PASダイマーペプチドの発現カセット）を、特開平9-322774に記載のpPK4のKpnI-BamHI部位に挿入することによって、CspAシグナル配列を利用したTPO-PASダイマーペプチドの分泌発現プラスミドであるpPK4_CspAss-TPO2-PAS8を構築した。挿入断片の塩基配列決定の結果、設計通りのTPO-PASダイマーペプチドの発現カセットが構築されていることを確認した。塩基配列の決定はBigDye（登録商標）Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）と3500xL Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を用いて行った。

[0153] （２３－５）CspBシグナル配列を利用したAET-TPO1-PAS8およびAET-TPO2-PAS8の各分泌発現プラスミドの構築

TPO-PASダイマーペプチドとして、上記（ｕ）AET-TPO1-PAS8（以下、「AET-TPO1-PAS8」と表記することがある。）、および（ｖ）AET-TPO2-PAS8（以下

、「AET-EP02-PAS8」と表記することがある。）の2種類のアミノ酸配列をそれぞれ設計し、これらタンパク質をコードする塩基配列をC. glutamicumのコドン使用頻度を考慮して設計した。さらに、C. glutamicumによる分泌発現を可能とするよう、それぞれ以下の発現カセットを設計した。

AET-TP01-PAS8は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-TP01-PAS8の融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-TP01-PAS8」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-TP01-PAS8をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１１９、１２０に示す。

[0154] CspBss-AET-TP01-PAS8をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctgcagagaccatcgaaggtcctaccctccgtcaatggctggctgctcgtgccgccgctcccgccgctcctgctccaatcgaaggtcccaccctccgtcagtggctggcagcccgcgcataa（配列番号：１１９）

CspBss-AET-TP01-PAS8のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETIEGPTLRQWLAARAAAPAAPAPIEGPTLRQWLAARA（配列番号：１２０）

[0155] AET-TP02-PAS8は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-TP02-PAS8の融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-TP02-PAS8」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-TP02-PAS8をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１２１、１２２に示す。

[0156] CspBss-AET-TP02-PAS8をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctgcagagaccggtggttgtgctgatggtcctaccttgcgtgaatggattccttctgcggcggcgctgctccggctgcccctgcccctggcggttgcgcagatggcccaaccctgcgcgaatggatctccttctgcggcggctaa（配列番号：１２１）

CspBss-AET-TP02-PAS8のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETGGCADGPTLREWISFCGGAAPAAPAPGGCADGPTLR EWISFCGG（配列番号：１２２）

[0157] CspBss-AET-TPO1-PAS8およびCspBss-AET-TPO2-PAS8に記載の塩基配列の上流にC. glutamicum ATCC13869株由来のcspB遺伝子のプロモーターを繋げ、さらに5’-側にKpnIサイト、3’-側にBamHIサイトを付加した、各TPO-PASダイマーペプチドの発現カセットを設計し、全合成した。全合成したDNA断片（TPO-PASダイマーペプチドの発現カセット）を、特開平9-322774に記載のpPK4のKpnI-BamHI部位に挿入することによって、CspBシグナル配列を利用した各TPO-PASダイマーペプチドの分泌発現プラスミドであるpPK4_CspBss-AET-TPO1-PAS8およびpPK4_CspBss-AET-TPO2-PAS8をそれぞれ構築した。挿入断片の塩基配列決定の結果、それぞれ設計通りのTPO-PASダイマーペプチドの発現カセットが構築されていることを確認した。塩基配列の決定はBigDye（登録商標）Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) と3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。

[0158] （２３－６）C. glutamicumにおける各TPO-PASダイマーペプチドの分泌発現

上記で構築したpPK4_CspAss-TPO2-PAS8、pPK4_CspBss-AET-TPO1-PAS8、およびpPK4_CspBss-AET-TPO2-PAS8を用いて、WO2016/171224に記載のC. glutamicum YDK0107株を形質転換し、YDK0107/pPK4_CspAss-TPO2-PAS8株、YDK0107/pPK4_CspBss-AET-TPO1-PAS8株、およびYDK0107/pPK4_CspBss-AET-TPO2-PAS8株を得た。

得られた各形質転換体を、25 mg/Lのカナマイシンを含むMMTG液体培地（グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3 g、硫酸アンモニウム 30 g、リン酸二水素カリウム 1.5 g、硫酸鉄七水和物 0.03 g、硫酸マンガン五水和物 0.03 g、チアミン塩酸塩 0.45 mg、ビオチン 0.45 mg、DL-メチオニン 0.15 g、大豆塩酸加水分解液（全窒素量 0.2 g）、炭酸カルシウム 50 g、水で1 Lにしてp H7.0に調整）でそれぞれ30℃、72時間培養した。

培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清6.5 μLをNuPAGE（登録商標）12% Bis-Tirs Gel (Thermo Fisher Scientific) を用いて還元SDS

-PAGEに供してからQuick-CBB（Wako）にて染色を行った。その結果、YDK0107/pPK4_CspBss-AET-TPO1-PAS8株の培養上清中にAET-TPO1-PAS8と推定されるタンパク質バンド（図３７、レーン２～５）、YDK0107/pPK4_CspAss-TPO2-PAS8株の培養上清中にTPO2-PAS8と推定されるタンパク質バンド（図３７、レーン６～９）、およびYDK0107/pPK4_CspBss-AET-TPO2-PAS8株の培養上清中にAET-TPO2-PAS8と推定されるタンパク質バンド（図３７、レーン１０～１３）がそれぞれ検出された。

[0159] 実施例２４：TPO-PASダイマーペプチドの分子量分析

実施例２３における培養後の、TPO-PASダイマーペプチドの菌体ろ過液について、LC-MS（Waters, LC-MS（Waters, ACQUITY UPLC/SQD2）を用いて分子量の測定を行った。分析条件は表２に記載のとおりである。図３８～４０に示すとおり、分子内で2つのジスルフィド結合を形成している酸化型の各ダイマーペプチドの分子量の理論値にほぼ同一の値が得られた。このことから、2つのジスルフィド結合を含む正しいアミノ酸配列のペプチドを発現できたことが確認された。

[0160] 実施例２５：TPO-PASダイマーペプチドの活性評価

TPO-PASダイマーペプチドのトロンボポエチン様活性はヒト白血病由来血球細胞株であるHEL細胞のチロシンリン酸化レベルの定量によって評価した。200,000 cellのHEL細胞をFBSを含まないRPMI1640培地（Thermo Fisher Scientific社）中で24時間培養し、飢餓状態にした。この細胞を、10-100 ng/mLのリコンビナントヒトTPO（rhTPO, Peprotech社）またはAET-TPO1-PAS8, TPO2-PAS8もしくはAET-TPO2-PAS8を含む培養上清を所定の希釈倍率で添加したRPMI1640培地で20分間刺激した。陰対照としては、PBS（Mock群）または空ベクターを用いることでペプチドを発現していない上清（Empty群）を加えて20分間刺激を行った。培地を除去し、PBSで一度細胞を洗浄した後、Protease inhibitor cocktail（ナカライテスク社）を添加したLysis buffer 17（R&D Systems社）を100 μL加えることで細胞を溶解した。溶解液を14,000 Gで5分間遠心し、上清をライセートとして得た。

PVDF膜（Immobilon-P メンブレン 0.45 μm, Merck社）をメタノールで1分間、続いて超純水で5分間処理し、親水処理を行った。PVDF膜を乾燥させ、各細胞溶解液を1 μLピペットでスポッティングし、乾燥させた。PVDF膜はPVDF Blocking Reagent for Can Get Signal（日油）で室温1時間ブロッキングを行った後、anti-pY抗体-HGF conjugate（Cell Signaling Technology）を1:5000で加えたCan Get Signal Solution 2（日油）を添加し、4 ℃, 24時間抗体反応を行った。TBSTバッファーで3回メンブレンを洗浄し、Luminata Crescendo Western HRP Substrate（Merck社）を添加し、化学発光反応を行った。化学発光はAmersham Imager 600（GE Healthcare社）を用いて検出を行った。検出されたドットの発光強度をImageJで定量した。

図４１に示す通り、AET-TP01-PAS8, AET-TP02-PAS8, TP02-PAS8の全てにおいてrhTP0と同等もしくはそれ以上のチロシンリン酸化レベルの上昇が認められた。この結果より、AET-TP01-PAS8, AET-TP02-PAS8, TP02-PAS8がTP0と同様にHEL細胞を活性化させたことが明らかになった。

図４２には、TP02-PAS8の濃度依存的なHEL細胞活性化能を示す。1/100-1/10000希釈の範囲内で、TP02-PAS8刺激群は100 ng/mLのrhTP0刺激群と同等以上の発光強度を示したことから、当該濃度域ではrhTP0と同等以上のHEL細胞活性化能を有することが明らかになった。

[0161] 実施例２６：TP0-PASダイマーペプチドのシグナル特性評価

TP0-PASダイマーペプチドのシグナル特性をProteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit（R&D Systems）を用いて評価した。

1,000,000 cellのHEL細胞をFBSを含まないRPMI1640培地（Thermo Fisher Scientific社）中で24時間培養し、飢餓状態にした。この細胞を、100 ng/mLのリコンビナントヒトTP0（rhTP0, Peprotech社)、または1/100-1/1000希釈となるようにTP02-PAS8を含む培養上清を添加したRPMI1640培地で20分間刺激した。陰対照としてはPBSを加えて20分間刺激を行った（Mock群）。培地を除去し、PBSで一度細胞を洗浄した後、Protease inhibitor cocktail（ナカライテスク社）を添加したLysis buffer 17（R&D Systems社）を200 μL加える

ことで細胞を溶解した。溶解液を14,000 Gで5分間遠心し、上清をライセートとして得た。

ライセートをProteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kitを用いて解析した。化学発光の検出にはAmersham Imager 600 (GE Healthcare社)を用いた。ドットの化学発光強度はImageJを用いて定量した。図４３に示す通り、PBSで刺激を行った細胞（Mock群）に対し、rhTPOまたはTPO2-PAS8で刺激を行った細胞は、Erk, CREB, Stat3, Stat5a, Stat5bのリン酸化レベルが上昇すること、また両者のリン酸化パターンが類似することが確認された。rhTPOが刺激するシグナル経路は主にJAK2/Stat3,5経路であり、リン酸化レベルが上昇したタンパク質の全てが経路に含まれる。この結果から、TPO2-PAS8はrhTPOと類似のシグナルを活性化することが確認された。

[0162] 実施例２７：VEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドの設計およびC. glutamicumにおけるその分泌発現

（２７－１）設計の概要

A. Shrivastava, et al. Protein Eng. Des. Select. 18, 417, 2005で報告されているVEGFR結合環状ペプチドP-3およびP-4をグルタル酸リンカーによってダイマー化したペプチドヘテロダイマー分子を、一つのポリペプチド鎖としてC. glutamicumで発現することは、以下の理由から行うことができない。ダイマー化は環状ペプチドP-3, P-4のそれぞれのC末端に配置したリジン残基のε-アミノ基同士をグルタル酸で結合することで達成されており、C. glutamicumで発現することができない。そのため、次のように分子に変換を加えることで、発現できる形にデザインした。グルタル酸リンカーの代わりにPAS配列を用いること、さらに一本のポリペプチド鎖として発現できるように「第一のVEGFR結合配列（P-3）」－「PASリンカー」－「第二のVEGFR結合配列（P-4）」となるようペプチド配列を設計することで対応した。すなわち、P-3のC末端とPASリンカーのN末端が、P-4のN末端とPASリンカーのC末端がそれぞれアミド結合で結合されており、一本のポリペプチド鎖として発現可能である。

[0163] （２７－２）VEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドの調製

調製したVEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドは以下のとおりである。

（ｗ）AET-VEGFR_D2-PAS16

AETAGPTWCEDDWYYCWLFGTAAPAAPAPAAPAAPAPVCWEDSWGGEVCWLFGT（配列番号：１２３）

[0164] （２７－３）VEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドの発現

Corynex（登録商標）を用いてVEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドの発現検討を行った。以下、Corynex（登録商標）による発現検討の実施例を記載する。

[0165] （２７－４）CspBシグナル配列を利用したAET-VEGFR_D2-PAS16分泌発現プラスミドの構築

VEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドとして、上記（ｗ）AET-VEGFR_D2-PAS16（以下、「AET-VEGFR_D2-PAS16」と表記することがあり、単に「VEGFR_D2-PAS16」と表記することがある。）のアミノ酸配列を設計し、このタンパク質をコードする塩基配列をC. glutamicumのコドン使用頻度を考慮して設計した。さらに、C. glutamicumによる分泌発現を可能とするよう、以下の発現力セットを設計した。

AET-VEGFR_D2-PAS16は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-VEGFR_D2-PAS16の融合タンパク質（以下、「CspBss-VEGFR_D2-PAS16」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-VEGFR_D2-PAS16をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１２４、１２５に示す。

[0166] CspBss-AET-VEGFR_D2-PAS16をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc

gtagctatcccagcattcgctgcagagaccgctggtcctacctggtgtgaagacgactggtactactgc

tggctgtttggcaccgctgctcccgctgcccctgctcctgccgctccggcagccccagctcctgtgtgt

tgggaagattcttggggcggcgaagtttgctggctgtttggcacctaa（配列番号：１２４）

CspBss-AET-VEGFR_D2-PAS16のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETAGPTWCEDDWYYCWLFGTAAPAAPAPAAPAAPAPVC
WEDSWGGEVCWLFGT（配列番号：１２５）

[0167] CspBss-AET-VEGFR_D2-PAS16に記載の塩基配列の上流にC. glutamicum ATCC 13869株由来のcspB遺伝子のプロモーターを繋げ、さらに5’-側にKpnIサイト、3’-側にBamHIサイトを付加した、VEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドの発現カセットを設計し、全合成した。全合成したDNA断片（VEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドの発現カセット）を、特開平9-322774に記載のpPK4のKpnI-BamHI部位に挿入することによって、CspBシグナル配列を利用したVEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドの分泌発現プラスミドであるpPK4_CspBss-AET-VEGFR_D2-PAS16を構築した。挿入断片の塩基配列決定の結果、設計通りのVEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドの発現カセットが構築されていることを確認した。塩基配列の決定はBigDye（登録商標）Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）と3500xL Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を用いて行った。

[0168] （２７－５）C. glutamicumにおけるVEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドの分泌発現

上記で構築したpPK4_CspBss-AET-VEGFR_D2-PAS16を用いて、WO2016/171224に記載のC. glutamicum YDK0107株を形質転換し、YDK0107/pPK4_CspBss-AET-VEGFR_D2-PAS16株を得た。

得られた形質転換体を、25 mg/Lのカナマイシンを含むMMTG液体培地（グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3 g、硫酸アンモニウム 30 g、リン酸二水素カリウム 1.5 g、硫酸鉄七水和物 0.03 g、硫酸マンガン五水和物 0.03 g、チアミン塩酸塩 0.45 mg、ビオチン 0.45 mg、DL-メチオニン 0.15 g、大豆塩酸加水分解液（全窒素量 0.2 g）、炭酸カルシウム 50 g、水で1LにしてpH7.0に調整）でそれぞれ30℃、72時間培養した。

培養終了後、培養液を遠心分離して得られた培養上清、あるいは遠心分離せずに菌体と培養上清を均一に含む培養液、それぞれ6.5 μLをNuPAGE（登録商標）12% Bis-Tirs Gel（Thermo Fisher Scientific）を用いて還元SDS-PAG

Eに供してからQuick-CBB（Wako）にて染色を行った。その結果、YDK0107/pPK4_CspBss-AET-VEGFR_D2-PAS16株の培養上清中にAET-VEGFR_D2-PAS16と推定されるタンパク質バンドがごく微量に検出され（図４５、レーン２）、一方で菌体を含む培養液サンプルにおいてAET-VEGFR_D2-PAS16と推定されるタンパク質のバンドが顕著に検出された（図４５、レーン３）。

以上の結果から、AET-VEGFR_D2-PAS16は分泌後、その多くが培養上清中に凝集して存在、あるいは培養菌体の細胞表層中に吸着して存在していると考えられた。

[0169] （２７－６）尿素処理によるVEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドの可溶化

上記で取得した、YDK0107/pPK4_CspBss-AET-VEGFR_D2-PAS16株の培養液を遠心分離して得られた菌体を含む沈殿画分に、除去した培養上清と等量の0.5 M Urea（50 mM Tris-HCl、pH 8.0）あるいは1.0 M Urea（50 mM Tris-HCl、pH 8.0）を添加して混合した。各Urea処理液を遠心分離して得られた上清画分、あるいは遠心分離せずに菌体と上清を均一に含む混合液、それぞれ6.5 μLをNuPAGE（登録商標）12% Bis-Tirs Gel（Thermo Fisher Scientific）を用いて還元SDS-PAGEに供してからQuick-CBB（Wako）にて染色を行った。その結果、0.5 M Ureaおよび1.0 M Urea処理サンプルにおいてAET-VEGFR_D2-PAS16と推定されるタンパク質バンドが上清に抽出され、可溶性画分として取得された（図４５、レーン６およびレーン８）。

[0170] 実施例２８：VEGFR_D2-PASヘテロダイマーの分子量分析

実施例２７における培養後の、VEGFR_D2-PASヘテロダイマーを発現させた菌体を8 M Ureaで洗浄した溶液について、菌体ろ過した後にLC-MS（Waters, ACQUITY UPLC/SQD2）を用いて分子量の測定を行った。分析条件は表５に示した。

[0171]

[表5]

LC set up				
System		ACQUITYUPLC H-Class /SQD2		
Column		TMC-Triart C8 50 x 2.0 mmI.D. 1.9 um, 12nm(TO12SP9-0502PT)		
Solvent	A	0.1% TFA		
	B	0.1% TFA, 80% Acetonitrile		
Flow rate		1.0 mL/min		
Column temp.		40 ℃		
Detection		220 nm		
Sample Vol.		10 uL		
Gradient program	Time (min)		%A	%B
	0		100	0
	50		100	100
	53		0	100
	53.1		100	0
	56		100	0
	56.1		0	100
	59		0	100
	59.1		100	0
	65		100	0

MS spectrometer set up	
Ion mode	ESI positive
Range	800-2500 m/z
Scan time	0.4 amu/sec
Capillary Voltage	2.0kV
Cone voltage	10V, 20V, 40V
Desolvation temp	500 ℃
Desolvation Gas Flow	1000 L/hr
Cone Gas Flow	50 L/hr
Software	Deconvolution is performed using "MassLynx"

[0172] 図４６に示すとおり、分子内で2つのジスルフィド結合を形成している酸化型のダイマーペプチドの分子量の理論値にほぼ同一の値が得られた。このことから、2つのジスルフィド結合を含む正しいアミノ酸配列のペプチドを発現できたことが確認された。

[0173] 実施例２９：VEGFR_D2-PASヘテロダイマーの活性評価

VEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドのVEGF阻害能をルシフェラーゼアッセイによって評価した。40,000 cell/wellのVEGFR / NFAT Reporter HEK293

細胞（BPS Bioscience社）を播種し、37 ℃、5% CO_2インキュベータ内で終夜インキュベートを行った。Assay medium（MEM培地（ナカライテスク社）、1x MEM Non-Essential Amino Acids Solution (Thermo Fisher Scientific社)、1 mM Sodium Pyruvate（ナカライテスク社)、1% Penicillin-Streptomycin (Sigma Aldrich社）、0.3% FBS （Thermo Fisher Scientific社））中で細胞を終夜インキュベートし、飢餓状態にした。Assay mediumに10 ng/mLのヒトリコンビナントVEGF（R&D Systems）を添加し、さらに所定の希釈倍率でHPLC精製を行ったVEGFR_D2-PAS16もしくはモノマーペプチドであるP3（AGPTWCEDDWYYCWLFGT（配列番号：７１）、ジェンスクリプトジャパン株式会社で合成），Pm4（VCWEDSWGGEVCWLFGT（配列番号：７２）、ジェンスクリプトジャパン株式会社で合成）を添加し、そのAssay mediumを細胞に100 μL添加した。37 ℃、5% CO_2インキュベータ内で4時間培養することで細胞への刺激を行った。

シグナル強度の検出にはOne-Glo Luciferase Assay System（Promega社）を使用した。50 μLの培地上清を除去し、One-Glo reagentを50 μL添加し、室温で10分細胞を溶解した。細胞の溶解液から発せられる発光をNivoプレートリーダー（Perkin Elmer社）で検出することでVEGFR-NFAT経路の活性化を定量し、評価化合物を加えていないサンプルに対する相対的なシグナル活性値を求め、相対的受容体活性（Relative reporter activity）とした。

図４７に示す通り、VEGFR_D2-PAS16はモノマーペプチドであるP3, Pm4よりも高い阻害活性を示したことから、環状ペプチドのヘテロ二量化により高い阻害活性が得られることが明らかになった。

[0174] 実施例３０：EPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の設計およびC. glutamicumにおけるその分泌発現

（３０－１）リンカー改変体の設計の概要

エリスロポエチン模倣ペプチドであるAET-EPO-PAS8およびAET-EPO-PAS22は、第一のエリスロポエチン受容体結合環状ペプチドと第二のエリスロポエチン受容体結合環状ペプチドの間を8アミノ酸または22アミノ酸からなるPASリ

ンカーで結合した構造を有している。このPASリンカーの長さを変えることで、エリスロポエチン受容体結合活性が変わることが予想される。そこで、PASリンカー部位を49アミノ酸または100アミノ酸のPAS反復配列に変えたリンカー改変体を設計した。

また、フレキシブルリンカーとしてはPASリンカーの他にグリシンとセリンの繰り返し配列であるGSリンカーも知られている。そこで、グリシン4残基とセリン1残基（GGGGS）の繰り返し配列からなるGSリンカーのN末端およびC末端にEPO環状ペプチドを結合させたリンカー改変体、すなわち「第一のエリスロポエチン受容体結合環状ペプチド」－「GSリンカー」－「第二のエリスロポエチン受容体結合環状ペプチド」となるようペプチド配列を設計した。

[0175] （３０－２）EPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の調製

調製したEPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体は以下のとおりである。

（ｘ）AET-EPO-PAS49

AETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAP

APAGGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：１２６）

（ｙ）AET-EPO-PAS49-b

AETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGSAPSPSSAPASASAPASPASASASASPASSPASASSASPAASSASP

ASSGGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：１２７）

（ｚ）AET-EPO-PAS100

AETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAP

APAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAGGLYACHMGPMTWVC

QPLRG（（配列番号：１２８）

（Ａ）AET-EPO-PAS100-b

AETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGSAPSPSSAPASASAPASPASASASASPASSPASASSASPAASSASP

ASSSASPSAPAAPSASAAPSASPASSSPAPASAPSPAAAASSPSPAPSSASSAAGGLYACHMGPMTWVC

QPLRG（配列番号：１２９）

（Ｂ）AET-EPO-GS8

AETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGGGGGSGGGGGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：１３０

）

（Ｃ）AET-EPO-GS22

AETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：１３１）

[0176] （３０－３）EPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の発現

Corynex（登録商標）を用いてこれらのEPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の発現検討を行った。以下、Corynex（登録商標）による発現検討の実施例を記載する。

[0177] （３０－４）CspBシグナル配列を利用したAET-EPO-PAS49、AET-EPO-PAS49-b、AET-EPO-PAS100、AET-EPO-PAS100-b、AET-EPO-GS8、およびAET-EPO-GS22の各分泌発現プラスミドの構築

EPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体として、上記（ｘ）AET-EPO-PAS49（以下、「AET-EPO-PAS49」と表記することがある。）、（ｙ）AET-EPO-PAS49-b（以下、「AET-EPO-PAS49-b」と表記することがある。）、（ｚ）AET-EPO-PAS100（以下、「AET-EPO-PAS100」と表記することがある。）、（Ａ）AET-EPO-PAS100-b（以下、「AET-EPO-PAS100-b」と表記することがある。）、（Ｂ）AET-EPO-GS8（以下、「AET-EPO-GS8」と表記することがある。）、および（Ｃ）AET-EPO-GS22（以下、「AET-EPO-GS22」と表記することがある。）の6種類のアミノ酸配列をそれぞれ設計し、これらタンパク質をコードする塩基配列をC. glutamicumのコドン使用頻度を考慮して設計した。さらに、C. glutamicumによる分泌発現を可能とするよう、それぞれ以下の発現カセットを設計した。

AET-EPO-PAS49は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-EPO-PAS49の融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-EPO-PAS49」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-EPO-PAS49をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１３２、１３３に示す。

[0178] CspBss-AET-EPO-PAS49をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagaccggtggtctctacgcctgtcacatgggtcctatgacctgg
gtgtgccaacctctccgtggtgccgcccccgccgcccccgcccccgccgccccagctgcaccagctcca
gcagccccagccgcaccagccccagcagctccagctgccccagcaccagcagcaccagccgctccagca
ccagctgctccagcagctccagccccagccggcggcctttacgcctgccacatgggtcctatgacctgg
gtttgccagcctcttcgcggttag（配列番号：１３２）

CspBss-AET-EPO-PAS49のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPAAPAAPAP
AAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAGGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：１３
３）

[0179] AET-EPO-PAS49-bは、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-EPO-PAS49-bの融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-EPO-PAS49-b」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-EPO-PAS49-bをコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１３４、１３５に示す。

[0180] CspBss-AET-EPO-PAS49-bをコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagaccggcggactgtacgcctgccatatggggccaatgacctgg
gtgtgccaaccgttgcgtggatcagcgccatcgccctcttccgctccagcctctgcgtctgctcccgca
tccccagcgtcagcttccgcatccgcttcgcctgcaagctcccctgctagcgcgtcctctgcctccgct
gcagcatcctcggcttccccggcaagctcaggtggcctctatgcctgccacatgggtccgatgacttgg
gtctgtcagccacttcgcggctaa（配列番号：１３４）

CspBss-AET-EPO-PAS49-bのアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGSAPSPSSAPASASAPA
SPASASASASPASSPASASSASPAASSASPASSGGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：１３
５）

[0181] AET-EPO-PAS100は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-EPO-PAS100の融合タンパク質（以下、「CspBss-AE

T-EPO-PAS100」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-EPO-PAS100をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１３６、１３７に示す。

[0182] CspBss-AET-EPO-PAS100をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagaccggtggtttgtacgcttgccacatgggtcctatgacctgg
gtttgtcagcctcttcgtggtgccgcccccgcagcccccgctcccgctgcaccagccgcaccagcacca
gcagctccagcagctccagcaccagctgcaccagccgccccagcaccagcagccccagccgctccagca
ccagctgccccagctgctccagctccagcagcaccagctgccccagccccagcagcaccagccgctcca
gccccagctgccccagcagctccagctccagctgctccagcagccccagcaccagccgccccagcagcc
ccagctccagctgcaccagctgcaccagccccagccgcaccagccggcggtttgtacgcttgccacatg
ggtccgatgacctgggtttgtcagcccccttcgcggttag（配列番号：１３６）

CspBss-AET-EPO-PAS100のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPAAPAAPAP
AAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAA
PAPAAPAAPAPAAPAGGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：１３７）

[0183] AET-EPO-PAS100-bは、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-EPO-PAS100-bの融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-EPO-PAS100-b」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-EPO-PAS100-bをコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１３８、１３９に示す。

[0184] CspBss-AET-EPO-PAS100-bをコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagaccggcggcttgtacgcctgccatatggggcctatgacctgg
gtctgccaaccactgcgtggaagcgcaccctcaccatcctccgcaccagctagcgcctccgctcctgca
agcccagcgtccgcatccgcttcggcctcaccagcgtcctctccagcttccgcttcgagcgctagccca
gcggcatcctctgcctccccagcctcctcgtctgcatccccgtccgctccagccgcaccttctgcatct
gcggctccgtccgcctccccggcatcttcctcgcctgctcccgcgtcagcgccttccccggctgcagcg

gcctcctctccgtcacccgctccttcaagcgcgtcgtctgcagcaggaggcctctatgcctgccacatg
ggtccgatgacttgggtgtgtcagcccttcgcggttaa（配列番号：１３８）

CspBss-AET-EPO-PAS100-bのアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGSAPSPSSAPASASAPA
SPASASASASPASSPASASSASPAASSASPASSSASPSAPAAPSASAAPSASPASSSPAPASAPSPAAA
ASSPSPAPSSASSAAGGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：１３９）

[0185] AET-EPO-GS8は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-EPO-GS8の融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-EPO-GS8」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-EPO-GS8をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１４０、１４１に示す。

[0186] CspBss-AET-EPO-GS8をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagaccggcggcctctatgcatgccatatggggccaatgacctgg
gtctgccaaccgttgcgtggcggaggtggcggttccggtggaggtggtggcctgtacgcttgccacatg
ggacccatgacttgggtgtgtcagcctcttcgcggctaa（配列番号：１４０）

CspBss-AET-EPO-GS8のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGGGGGSGGGGGLYACHM
GPMTWVCQPLRG（配列番号：１４１）

[0187] AET-EPO-GS22は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-EPO-GS22の融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-EPO-GS22」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-EPO-GS22をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１４２、１４３に示す。

[0188] CspBss-AET-EPO-GS22をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagaccggtgggctgtatgcttgccatatggggcctatgacttgg
gtgtgccaacccttgcgtggtggaggcggaggctccggcggtggtgggagcggaggaggcggttccggt

ggcggtggctctggcggaggcggcctctacgcatgccacatgggtccgatgacctgggtctgtcagcca

cttcgcggctaa（配列番号：１４２）

CspBss-AET-EPO-GS22のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGGGGSGGGGSGGGGSG

GGGSGGGGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：１４３）

[0189] CspBss-AET-EPO-PAS49、CspBss-AET-EPO-PAS49-b、CspBss-AET-EPO-PAS100、CspBss-AET-EPO-PAS100-b、CspBss-AET-EPO-GS8、およびCspBss-AET-EPO-GS22に記載の塩基配列の上流にC. glutamicum ATCC13869株由来のcspB遺伝子のプロモーターを繋げ、さらに5’-側にKpnIサイト、3’-側にBamHIサイトを付加した、各EPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の発現カセットを設計し、全合成した。全合成したDNA断片（EPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の発現カセット）を、特開平9-322774に記載のpPK4のKpnI-BamHI部位に挿入することによって、CspBシグナル配列を利用した各EPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の分泌発現プラスミドであるpPK4_CspBss-AET-EPO-PAS49、pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS49-b、pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS100、pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS100-b、pPK4_CspBss-AET-EPO-GS8、およびpPK4_CspBss-AET-EPO-GS22をそれぞれ構築した。挿入断片の塩基配列決定の結果、それぞれ設計通りのEPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の発現カセットが構築されていることを確認した。塩基配列の決定はBigDye（登録商標）Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) と3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。

[0190] （３０－５）C. glutamicumにおける各EPO-PASダイマーペプチドの分泌発現

上記で構築したpPK4_CspBss-AET-EPO-PAS49、pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS49-b、pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS100、pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS100-b、pPK4_CspBss-AET-EPO-GS8、およびpPK4_CspBss-AET-EPO-GS22を用いて、WO2016/171224に記載のC. glutamicum YDK0107株を形質転換し、YDK0107/pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS49株、YDK0107/pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS49-b株、YDK0107/pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS100株、YDK0107/pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS100-b株、YDK0107

/pPK4_CspBss-AET-EPO-GS8株、およびYDK0107/pPK4_CspBss-AET-EPO-GS22株を得た。

得られた各形質転換体を、25 mg/Lのカナマイシンを含むMMTG液体培地（グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3 g、硫酸アンモニウム 30 g、リン酸二水素カリウム 1.5 g、硫酸鉄七水和物 0.03 g、硫酸マンガン五水和物 0.03 g、チアミン塩酸塩 0.45 mg、ビオチン 0.45 mg、DL-メチオニン 0.15 g、大豆塩酸加水分解液（全窒素量 0.2 g）、炭酸カルシウム 50 g、水で1 Lにしてp H7.0に調整）でそれぞれ30℃、72時間培養した。

培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清6.5 μLをNuPAGE（登録商標）12% Bis-Tirs Gel（Thermo Fisher Scientific）を用いて還元SDS-PAGEに供してからQuick-CBB（Wako）にて染色を行った。その結果、YDK0107/pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS49株の培養上清中にAET-EPO-PAS49と推定されるタンパク質バンド（図４８、レーン２～５）、YDK0107/pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS49-b株の培養上清中にAET-EPO-PAS49-bと推定されるタンパク質バンド（図４８、レーン６～９）、YDK0107/pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS100株の培養上清中にAET-EPO-PAS100と推定されるタンパク質バンド（図４８、レーン１０～１３）、YDK0107/pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS100-b株の培養上清中にAET-EPO-PAS100-bと推定されるタンパク質バンド（図４８、レーン１４～１７）、YDK0107/pPK4_CspBss-AET-EPO-GS8株の培養上清中にAET-EPO-GS8と推定されるタンパク質バンド（図４８、レーン１８～２１）、およびYDK0107/pPK4_CspBss-AET-EPO-GS22株の培養上清中にAET-EPO-GS22と推定されるタンパク質バンド（図４８、レーン２２～２５）がそれぞれ検出された。

[0191] 実施例３１：EPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の分子量分析

実施例３０における培養後の、EPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の菌体ろ過液について、LC-MS（Waters, LC-MS（Waters, ACQUITY UPLC/SQD2）を用いて分子量の測定を行った。分析条件は表２に記載のとおりである。図４９～５４に示すとおり、分子内で2つのジスルフィド結合を形成している酸化型の各ダイマーペプチドの分子量の理論値にほぼ同一の値が得られた。こ

のことから、2つのジスルフィド結合を含む正しいアミノ酸配列のペプチドを発現できたことが確認された。

[0192] 実施例３２：EPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の活性評価

EPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体のEpoR活性化能はPathHunter（登録商標） eXpress EpoR-JAK2 Functional Assay Kit（DiscoverX社）を用いて評価した。

96-wellプレートにPathHunter（登録商標） eXpress EpoR-JAK2 Functional Assay Kitに含まれるEPO活性評価用細胞を播種し、24時間37 ℃、5% CO_2下で培養を行った。細胞に対し、所定の濃度に希釈されたAET-EPO-PAS8、AET-EPO-GS8、AET-EPO-PAS22、もしくはAET-EPO-GS22を含む培養上清（培養は実施例２０又は３０に記載のとおり）を添加した。陰対照としては、EPO-PASダイマーペプチド発現用遺伝子を含まないベクターを用いること以外は実施例３０に記載のとおり培養を行って得た培養上清（図４８、レーン２６）を、AET-EPO-PAS8もしくはAET-EPO-PAS22を含む培養上清と同様の倍率で希釈したものを添加した。3時間室温で刺激した細胞に対し、調製したSubstrate Reagentを添加し、60分インキュベートした。化学発光強度をNivoプレートリーダー（Perkin Elmer社）で定量した。

図５５～５７に示すように、全てのダイマーペプチドがEpoRを濃度依存的に活性化することが明らかになった。各コンストラクトのEC50値は下記表６に示すとおりであり、AET-EPO-PAS8はAET-EPO-GS8より高い活性を示し、AET-EPO-PAS22はAET-EPO-GS22より高い活性を有することが明らかになった。なお、rhEPO、AET-EPO-PAS8およびAET-EPO-PAS22のEC50値は実施例２２における ものである。また、AET-EPO-PAS100はAET-EPO-PAS49、AET-EPO-PAS22、AET-EPO-PAS8より低い活性であることが明らかになった。このことから、PASリンカーを用いることでGSリンカーに比して高い活性を、49アミノ酸以下のPASリンカーを用いることで、高いアゴニスト活性を有するダイマーペプチドが開発できることが明らかになった。

[0193]

[表6]

ペプチド	EC50 (g/L)
rhEPO	1.1×10^{-6}
AET-EPO-PAS8	1.9×10^{-7}
AET-EPO-GS8	5.3×10^{-7}
AET-EPO-PAS22	3.4×10^{-7}
AET-EPO-GS22	1.3×10^{-6}
AET-EPO-PAS49	4.3×10^{-6}
AET-EPO-PAS100	6.6×10^{-6}

[0194] 実施例３３：安定化EPO-PASダイマーペプチドの設計およびC. glutamicumにおけるその分泌発現

（３３－１）設計の概要

安定性を高めたEPO-PASペプチドは、以下のように設計した。ペプチドやタンパク質の安定性を高める手法として、長鎖のPAS配列を付加する方法が報告されている（特表2013-531480及び特表2010-531139）。安定性を高めたEPO-PASペプチドとして、AET-EPO-PAS22のC末端に200アミノ酸からなるPAS配列（PAS200）または600アミノ酸からなるPAS配列（PAS600）を結合させたペプチドを設計した。すなわち「第一のエリスロポエチン受容体結合環状ペプチド」－「PASリンカー」－「第二のエリスロポエチン受容体結合環状ペプチド」－「長鎖PAS配列（PAS200またはPAS600）」となるようペプチド配列を設計した。

[0195] （３３－２）安定化EPO-PASダイマーペプチドの調製

調製した安定化EPO-PASダイマーペプチドは以下のとおりである。

（Ｄ）AET-EPO-PAS22-PAS200

AETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAP（配列番号：１４４）

（E）AET-EPO-PAS22-PAS600

AETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPA
APAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPA
APAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAP
APAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAP
AAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAA
PAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAA
PAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPA
PAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPA
APAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAP（配列番号：１４５）

[0196] （３３－３）安定化EPO-PASダイマーペプチドの発現

Corynex（登録商標）を用いて安定化EPO-PASダイマーペプチドの発現検討を行った。以下、Corynex（登録商標）による発現検討の実施例を記載する。

[0197] （３３－４）CspBシグナル配列を利用したAET-EPO-PAS22-PAS200分泌発現プラスミドの構築

安定化EPO-PASダイマーペプチドとして、上記（Ｄ）AET-EPO-PAS22-PAS200（以下、「AET-EPO-PAS22-PAS200」と表記することがある。）および（Ｅ）AET-EPO-PAS22-PAS600（以下、「AET-EPO-PAS22-PAS600」と表記することがある。）のアミノ酸配列を設計し、これらのタンパク質をコードする塩基配列をC. glutamicumのコドン使用頻度を考慮して設計した。さらに、C. glutamicumによる分泌発現を可能とするよう、以下の発現カセットを設計した。

AET-EPO-PAS22-PAS200は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-EPO-PAS22-PAS200の融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-EPO-PAS22-PAS200」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-EPO-PAS22-PAS200をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１４６、１４７に示す。

[0198] CspBss-AET-EPO-PAS22-PAS200をコードする塩基配列

atgttcaacaaccgtattcgtaccgctgccctggccggcgccattgccatctccaccgctgcgtccggc

gtcgccattcctgcgttcgcagccgaaaccggcggcctgtacgcatgccacatgggtccaatgacctgg

gtgtgccagccactgcgcggcgctgcaccagctgctccagcaccagcagccccagctgcaccagcacca

gctgctccagctgcaccaggcggcctgtacgcttgtcatatgggtccaatgacttgggtctgccagcca

ctccgcggcgctgcaccagcagctcctgctccagcagcacctgcagcaccagcaccagcagctccagca

gcacctgccccagcagctcctgcagctcctgccccagcagcacctgccgctcctgctcctgcagctcca

gcagcacccgccccagcagctcccgcagctcctgcgccagcagcacctgccgcccctgctcccgcagct

ccagcagcaccggcacccgcagctccagcagctcctgcacctgcagcacctgccgctcccgctccggca

gctccagcagcaccagcccctgcagctcctgctgcacctgctccagcagcacccgcggctcctgctccg

gctgctccagcagcccctgctccagcagctcccgctgcacctgcaccagcagcacctgccgcgcctgct

cctgctgcccctgctgctcctgctcctgcagcccctgctgcacccgctccagcagcacctgcggctcct

gctccggccgcccctgctgctccagcaccagctgcccctgcagcccctgcccctgcagccccagctgca

ccagcaccagcagcaccagcagcacccgcaccagcagccccagcagccccagcccttag（配列番

号：１４６）

CspBss-AET-EPO-PAS22-PAS200のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPAAPAAPAP

AAPAAPGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAP

AAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAP

AAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAA

PAPAAPAAPAPAAPAAPAP（配列番号：１４７）

[0199] AET-EPO-PAS22-PAS600は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-EPO-PAS22-PAS600の融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-EPO-PAS22-PAS600」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-EPO-PAS22-PAS600をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１４８、１４９に示す。

[0200] CspBss-AET-EPO-PAS22-PAS600をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtattcgtaccgctgccctcgctggtgccattgccatctctaccgctgcgtccggc

gtcgctattcctgcctttgcagccgaaaccggcggcctgtacgcatgccacatgggtccaatgacctgg

gtgtgccagccactccgcggcgctgcaccagcagctccagcaccagcagccccagctgcaccagctcca

gctgctccagctgcaccaggcggcctgtacgcttgtcatatgggtccaatgacttgggtctgtcaacct

ctgcgcggcgctgctcctgcagctccagctccagcagcaccagctgcaccagcccctgctgcaccagca

gcaccagcaccagcagcaccagctgcccctgcccctgctgccccagctgcaccagcccccgctgcccct

gccgctcctgctcctgcagcaccagctgcccccgcccctgctgctcctgcagcccctgctcccgctgcc

cctgccgcccccgcccctgcagcaccagctgcgcctgccccgctgcgccagctgcaccagccccggct

gcccctgccgctcccgccccgcagcaccagctgccccggccccggctgcgcctgctgcaccagctcct

gctgcccctgccgctccggccccggcagcaccagctgccccagcacctgctgcaccagctgcaccagcg

cctgctgcccctgccgccccggcccccgcagctcctgctgccccgcacctgccgcaccagctgcacca

gcacctgctgctcccgccgctcctgctcccgcagcaccagctgcgcccgccccggctgcgcccgcagcc

cctgctcccgccgcacctgctgctcccgcgcctgcagcaccagctgctcctgcacctgctgctcctgcc

gctccagctcctgctgccccggccgctcctgctccggcagcaccagctgcgccggcccccgctgccccc

gcagcccctgctccggctgccctgccgccctgctccagcagctcctgctgccccagcacctgccgct

cctgcagctcctgctccagctgcccctgccgctccagccccagcagcaccagctgcgccagcacctgcc

gctcccgcagctcctgctccagccgcacctgctgctccggcgcccgcagcaccagctgctcccgcacct

gcggctccagcagcccctgcccctgctgcgcctgccgctcctgctccagcagctcccgctgcacctgcc

ccggccgctccagctgcaccagccccagctgctccagccgctcccgctccggcagctcctgctgctccc

gctccggctgctcctgccgcaccagctcctgcagctccagcagcccccgctccggcagctcccgctgct

cccgctccagccgctcctgcagccccagcaccagctgctccagccgcccccgctccggcagcccctgct

gctcccgctcccgctgctcctgcggcaccagctcccgcagctccagcagccccggctccggcagctccg

gctgctcccgctcccgccgctcccgcagcccctgctccagctgctccagccgcgcccgctccagcagct

ccagctgcacctgctccggccgcccctgccgctccagctccggcagctccagcagccccagcgcctgca

gctcctgctgctccggctccagccgctcccgcagcccccgctccagctgctccagcggctcccgctcca

gcagccccccgccgcacctgctccagccgctccggcagccccagctccagccgctccagccgctccagcg

cctgcagctccagcggctcccgccccagccgctcctgcagcgccagctccagcggctcctgccgctcct

gcccctgcagctccagcagcgcccgctccagccgccccggcagctcctgctcctgctgctccagccgct

ccagcacctgcagctccagcagctcctgccccagccgctcccgcagcgccagctccagcagcgccggct

gcaccggcccctgcagcaccagccgctcccgctcccgctgctcccgccgcccccgcacccgccgccccc

gctgctcccgctccctaa（配列番号：１４８）

CspBss-AET-EPO-PAS22-PAS600のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPAAPAAPAP

AAPAAPGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAP

AAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAP

AAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAA

PAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAPAA

PAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPA

PAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPA

APAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPA

APAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAP

APAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAP

AAPAP（配列番号：１４９）

[0201] CspBss-AET-EPO-PAS22-PAS200およびCspBss-AET-EPO-PAS22-PAS600に記載の塩基配列の上流にC. glutamicum ATCC13869株由来のcspB遺伝子のプロモーターを繋げ、さらに5’-側にKpnIサイト、3’-側にBamHIサイトを付加した、各安定化EPO-PASダイマーペプチドの発現カセットを設計し、全合成した。全合成したDNA断片（安定化EPO-PASダイマーペプチドの発現カセット）を、特開平9-322774に記載のpPK4のKpnI-BamHI部位に挿入することによって、CspBシグナル配列を利用した各安定化EPO-PASダイマーペプチドの分泌発現プラスミドであるpPK4_CspBss-AET-EPO-PAS22-PAS200およびpPK4_CspBss-AET-EPO-PAS22-PAS600をそれぞれ構築した。挿入断片の塩基配列決定の結果、設計通りの安定化EPO-PASダイマーペプチドの発現カセットが構築されていることを確認した。塩基配列の決定はBigDye（登録商標）Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) と3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems）を用いて行った。

[0202] （３３－５）C. glutamicumにおける安定化EPO-PASダイマーペプチドの分泌発現

上記で構築したpPK4_CspBss-AET-EPO-PAS22-PAS200およびpPK4_CspBss-AET-EPO-PAS22-PAS600を用いてWO2016/171224に記載のC. glutamicum YDK0107株を形質転換し、YDK0107/pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS22-PAS200株およびYDK0107/pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS22-PAS600株を得た。

得られた各形質転換体を、25 mg/Lのカナマイシンを含むMMTG液体培地（グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3 g、硫酸アンモニウム 30 g、リン酸二水素カリウム 1.5 g、硫酸鉄七水和物 0.03 g、硫酸マンガン五水和物 0.03 g、チアミン塩酸塩 0.45 mg、ビオチン 0.45 mg、DL-メチオニン 0.15 g、大豆塩酸加水分解液（全窒素量 0.2 g）、炭酸カルシウム 50 g、水で1 LにしてpH7.0に調整）でそれぞれ30℃、72時間培養した。

培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清6.5 μLをNuPAGE（登録商標）4-12% Bis-Tirs Gel (Thermo Fisher Scientific) を用いて還元SDS-PAGEに供してからQuick-CBB (Wako) にて染色を行った。その結果、YDK0107/pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS22-PAS200株の培養上清中にAET-EPO-PAS22-PAS200と推定されるタンパク質バンド（図５８、レーン２～５）、YDK0107/pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS22-PAS600株の培養上清中にAET-EPO-PAS22-PAS600と推定されるタンパク質バンド（図５８、レーン６～９）がそれぞれ検出された。

[0203] 実施例３４：安定化EPO-PASダイマーペプチドの分子量分析

実施例３３における培養後の、各安定化EPO-PASダイマーペプチドの菌体ろ過液について、LC-MS (Waters, LC-MS (Waters, ACQUITY UPLC/SQD2) を用いて分子量の測定を行った。分析条件は表２に記載のとおりである。図５９及び６０に示すとおり、分子内で2つのジスルフィド結合を形成している酸化型の各ダイマーペプチドの分子量の理論値にほぼ同一の値が得られた。このことから、2つのジスルフィド結合を含む正しいアミノ酸配列のペプチドを発現できたことが確認された。

[0204] 実施例３５：安定化EPO-PASダイマーペプチドの活性評価

安定化EPO-PASダイマーペプチドのEpoR活性化能はPathHunter（登録商標）eXpress EpoR-JAK2 Functional Assay Kit (DiscoverX社) を用いて評価し

た。

96-wellプレートにPathHunter（登録商標） eXpress EpoR-JAK2 Functional Assay Kitに含まれるEPO活性評価用細胞を播種し、24時間37 ℃、5% CO_2下で培養を行った。細胞に対し、14.2 μg/Lから220 pg/LのAET-EPO-PAS22、AET-EPO-PAS22-PAS200またはAET-EPO-PAS22-PAS600を含む培養上清（培養は実施例２０又は３３に記載のとおり）を添加した。陰対照としては、EPO-PASダイマーペプチド発現用遺伝子を含まないベクターを用いること以外は実施例３３に記載のとおり培養を行って得た培養上清（図５８、レーン２０）を、AET-EPO-PAS22、AET-EPO-PAS22-PAS200またはAET-EPO-PAS22-PAS600を含む培養上清と同様の倍率で希釈したものを添加した。3時間室温で刺激した細胞に対し、調製したSubstrate Reagentを添加し、60分インキュベートした。化学発光強度をNivoプレートリーダー（Perkin Elmer社）で定量した。

図６１に示すように、AET-EPO-PAS22、AET-EPO-PAS22-PAS200およびAET-EPO-PAS22-PAS600は濃度依存的にEpoRを活性化することが明らかになった。また、EC50値は下記表７の通り算出され、C末端への安定化修飾を施してもEPO-PASダイマーペプチドのアゴニスト能が低下しないことが明らかになった。なお、AET-EPO-PAS22のEC50値は実施例２２におけるものである。

[0205] [表7]

ペプチド	EC50 (g/L)
AET-EPO-PAS22	3.4×10^{-7}
AET-EPO-PAS22-PAS200	8.5×10^{-7}
AET-EPO-PAS22-PAS600	3.2×10^{-7}

[0206] 実施例３６：ダイマーペプチドの無細胞発現

（３６－１）無細胞発現用ダイマーペプチドの遺伝子コンストラクト構築

無細胞発現を行うダイマーペプチドとして、以下を設計した。

（Ｆ）MAET-aMD4dY-PAS22

MAETCRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPGCRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：１５０）

（Ｇ）MAET-aMD4dY-PAS8

MAETCRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPGCRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：１５１）

（Ｈ）MAET-aMD4-PAS22

MAETCYRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPGCRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：１５２）

（Ｉ）MAET-EPO-PAS8

MAETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGAAPAAPAPGGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：１５３）

（Ｊ）MAET-EPO-PAS49-b

MAETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGSAPSPSSAPASASAPASPASASASASPASSPASASSASPAASSASPASSGGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：１５４）

（Ｋ）MAET-EPO-PAS100-b

MAETGGLYACHMGPMTWVCQPLRGSAPSPSSAPASASAPASPASASASASPASSPASASSASPAASSASPASSSASPSAPAAPSASAAPSASPASSSPAPASAPSPAAAASSPSPAPSSASSAAGGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：１５５）

（Ｌ）MAET-VEGFR_D2-PAS16

MAETAGPTWCEDDWYYCWLFGTAAPAAPAPAAPAAPAPVCWEDSWGGEVCWLFGT（配列番号：１５６）

（Ｍ）MAET-VEGFR_D2-PAS49-b

MAETAGPTWCEDDWYYCWLFGTSAPSPSSAPASASAPASPASASASASPASSPASASSASPAASSASPASSVCWEDSWGGEVCWLFGT（配列番号：１５７）

（Ｎ）MAET-VEGFR_D2-PAS100-b

MAETAGPTWCEDDWYYCWLFGTSAPSPSSAPASASAPASPASASASASPASSPASASSASPAASSASPASSSSASPSAPAAPSASAAPSASPASSSPAPASAPSPAAAASSPSPAPSSASSAAVCWEDSWGGEVCWLFGT（配列番号：１５８）

（Ｏ）MAET-VEGFR_D2-GS16

MAETAGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGGSGGGGSGGGGSGVCWEDSWGGEVCWLFGT（配列番号：１５９）

[0207] 上記ダイマーペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を設計した。さらに、これらの5’側には無細胞発現に必要なT7プロモーター配列およびリボソーム結合配列を付加し、3’側には終始コドンと非翻訳領域を付加した。対応する無細胞発現用塩基配列をそれぞれ以下に示す。これらのDNA配列はユーロフィンジェノミクス株式会社にて全合成およびpEX-K4J2ベクターへのクローニングを行った。

MAET-aMD4dY-PAS22をコードする塩基配列

gaaattaatacgactcactatagggagaccacaacggtttccctctagaaataattttgtttaacttta

agaaggagatataccaatgcagagacctgtcgtcagtttaaccgtcgtacgcacgaagtttggaatctg

gactgtggcgcagcccccgcagcaccagctccagcagcacccgcagctccagcaccagcagcccctgca

gccccaggctgccgccaattcaatcgccgcacccatgaagtgtggaacttagattgctagtgaataact

aatcc（配列番号：１６０）

MAET-aMD4dY-PAS8をコードする塩基配列

gaaattaatacgactcactatagggagaccacaacggtttccctctagaaataattttgtttaacttta

agaaggagatataccaatggcagagacctgtcgtcagtttaaccgtcgtacgcacgaagtttggaatct

ggactgtggcgcagcacccgcagctccagcaccaggctgccgccaattcaatcgccgcacccatgaagt

gtggaacttagattgctagtgaataactaatcc（配列番号：１６１）

MAET-aMD4-PAS22をコードする塩基配列

gaaattaatacgactcactatagggagaccacaacggtttccctctagaaataattttgtttaacttta

agaaggagatataccaatggcagagacctgttatcgtcagtttaaccgtcgtacgcacgaagtttggaa

tctggactgtggcgcagcccccgcagcaccagctccagcagcacccgcagctccagcaccagcagcccc

tgcagccccaggctgctatcgccaattcaatcgccgcacccatgaagtgtggaacttagattgctagtg

aataactaatcc（配列番号：１６２）

MAET-EPO-PAS8をコードする塩基配列

gaaattaatacgactcactatagggagaccacaacggtttccctctagaaataattttgtttaacttta

agaaggagatataccaatggcagaaactggtggtttatacgcctgtcacatgggcccgatgacttgggt

ttgccagccattgcgtggcgcagcacccgcagctccagcaccaggtggcctgtatgcgtgccatatggg

gccaatgacctgggtgtgtcagccgttacgcggctagtgaataactaatcc（配列番号：１６３

)

MAET-EPO-PAS49-bをコードする塩基配列

gaaattaatacgactcactatagggagaccacaacggtttccctctagaaataattttgtttaacttta

agaaggagatataccaatggcagaaactggtggtttatacgcctgtcacatgggcccgatgacttgggt

ttgccagccattgcgtggctctgctccatcaccttcttccgcaccagcatcagcttctgcaccagcgtc

gcctgcttctgcatctgcgtctgcttcaccagcatcctcacctgcatcagcatcgtctgcttctccagc

agcttcctcagcttcacctgcttcgtctggtggcctgtatgcgtgccatatggggccaatgacctgggt

gtgtcagccgttacgcggctagtgaataactaatcc（配列番号：１６４）

MAET-EPO-PAS100-bをコードする塩基配列

gaaattaatacgactcactatagggagaccacaacggtttccctctagaaataattttgtttaacttta

agaaggagatataccaatggcagaaactggtggtttatacgcctgtcacatgggcccgatgacttgggt

ttgccagccattgcgtggctctgctccatcaccttcttccgcaccagcatcagcttctgcaccagcgtc

gcctgcttctgcatctgcgtctgcttcaccagcatcctcacctgcatcagcatcgtctgcttctccagc

agcttcctcagcttcacctgcttcgtcttccgcatccccatctgctccagcagcaccttcagcttctgc

agctccatctgcttcacctgcctcatcgtctccagcacctgcgtcagctccatcccctgcagcagcggc

ttcatcgccatctccagcaccttcttcagcgtcatccgctgcaggtggcctgtatgcgtgccatatggg

gccaatgacctgggtgtgtcagccgttacgcggctagtgaataactaatcc（配列番号：１６５

）

MAET-VEGFR_D2-PAS16をコードする塩基配列

gaaattaatacgactcactatagggagaccacaacggtttccctctagaaataattttgtttaacttta

agaaggagatataccaatggcggaaaccgcgggtcccacgtggtgtgaggatgactggtactattgctg

gttattcgggactgcggcccctgctgccccggctccggcagcaccggccgcaccagcgccggtttgctg

ggaagatagctggggtggcgaagtgtgttggctgtttggcacctagtgaataactaatcc（配列番

号：１６６）

MAET-VEGFR_D2-PAS49-bをコードする塩基配列

gaaattaatacgactcactatagggagaccacaacggtttccctctagaaataattttgtttaacttta

agaaggagatataccaatggcggaaaccgcgggtcccacgtggtgtgaggatgactggtactattgctg

gttattcgggacttctgctccatcaccttcttccgcaccagcatcagcttctgcaccagcgtcgcctgc

ttctgcatctgcgtctgcttcaccagcatcctcacctgcatcagcatcgtctgcttctccagcagcttc
ctcagcttcacctgcttcgtctgtttgctgggaagatagctggggtggcgaagtgtgttggctgtttgg
cacctagtgaataactaatcc（配列番号：１６７）

MAET-VEGFR_D2-PAS100-bをコードする塩基配列

gaaattaatacgactcactatagggagaccacaacggtttccctctagaaataattttgtttaacttta
agaaggagatataccaatggcagaaactggtggtttatacgcctgtcacatgggcccgatgacttgggt
ttgccagccattgcgtggctctgctccatcaccttcttccgcaccagcatcagcttctgcaccagcgtc
gcctgcttctgcatctgcgtctgcttcaccagcatcctcacctgcatcagcatcgtctgcttctccagc
agcttcctcagcttcacctgcttcgtcttccgcatccccatctgctccagcagcaccttcagcttctgc
agctccatctgcttcacctgcctcatcgtctccagcacctgcgtcagctccatcccctgcagcagcggc
ttcatcgccatctccagcaccttcttcagcgtcatccgctgcaggtggcctgtatgcgtgccatatggg
gccaatgacctgggtgtgtcagccgttacgcggctagtgaataactaatcc（配列番号：１６８
）

MAET-VEGFR_D2-GS16をコードする塩基配列

gaaattaatacgactcactatagggagaccacaacggtttccctctagaaataattttgtttaacttta
agaaggagatataccaatggcggaaaccgcgggtcccacgtggtgtgaggatgactggtactattgctg
gttattcgggactggtagcggtagcggcagcggcagcggtagtggtagtggcagcggcagcgtttgctg
ggaagatagctggggtggcgaagtgtgttggctgtttggcacctagtgaataactaatcc（配列番
号：１６９）

[0208] （３６－２）ダイマーペプチドの無細胞発現

上記で構築したダイマーペプチドの遺伝子をPCRにより増幅した。PCRは以下に示す配列のプライマーとPCR酵素としてKOD -Plus- Ver.2（東洋紡）を用いて行った。

Cell-free primer Fwd：

gaaattaatacgactcactataggg（配列番号：１７０）

Cell-free primer Rev：

cactgactggattagttattcac（配列番号：１７１）

[0209] 次に、PCRにより増幅した遺伝子断片を基に、ペプチドダイマーを無細胞発

現系によって発現した。無細胞発現にはPURExpress2.0（ジーンフロンティア）を用いた。

PURExpress2.0で無細胞発現を行う場合、2 nMのPCRで増幅した遺伝子断片に対し、10 μLのSolution I、1 μLのSolution II、2 μLのSolution III、7 μLの水を添加し、37 ℃で6時間インキュベーションすることで翻訳反応を行った。

[0210] （３６－３）無細胞発現ダイマーペプチドの分子量分析

HGF-PASダイマーペプチド（MAET-aMD4-PAS22, MAET-aMD4dY-PAS8, MAET-aMD4dY-PAS22）、EPO-PASダイマーペプチド（MAET-EPO-PAS8, MAET-EPO-PAS49-b、MAET-EPO-PAS100-b）、VEGFR_D2-PASダイマーペプチド（MAET-VEGFR_D2-PAS16）を無細胞発現系にて発現した溶液をα-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (CHCA)と混合し、MALDI-TOF-MS (Shimadzu, AXIMA TOF2)で分子量の測定を行った。

図６２～６８に示すように、HGF-PASダイマーペプチドに関してはジスルフィド結合を2つ形成し、N末端がホルミル化されている分子量に近い値が、EPO-PASダイマーペプチドとVEGFR_D2-PASダイマーペプチドに関してはジスルフィド結合を2つ形成し、N末端がホルミル化されている分子量およびN末端が脱ホルミル化されていない分子量の両方得られ、それぞれ2つのジスルフィド結合を含むダイマーペプチドが発現できたことが確認された。

[0211] 実施例３７：無細胞発現HGF-PASダイマーペプチドの活性評価

無細胞発現HGF-PASダイマーペプチドのMet活性化能をルシフェラーゼアッセイによって評価した。Opti-MEM培地（Thermo Fisher Scientific社）25 μLに対し、0.6 μLのAttractene Transfection Reagent（QIAGEN社）を添加し、室温で5分インキュベートを行った。上記混合溶液に対し、Opti-MEM 25 μLと1 μLのSRE reporter vector（QIAGEN社）の混合溶液を加え、室温で20分インキュベートを行った。この混合溶液を96-well plateに添加し、その上から40,000 cell/wellのHEK293E細胞を播種し、37 ℃、5% CO_2インキュベータ内で終夜インキュベートを行った。トランスフェクション後、培養上清を全て

除去し、0.5% FBS（Thermo Fisher Scientific社）、1% 非必須アミノ酸溶液（Thermo Fisher Scientific社）およびペニシリン－ストレプトマイシン（ナカライテスク社）を含むOpti-MEM培地（評価基礎培地）を100 μL添加し、37 ℃で4時間培養することで、細胞を飢餓状態にした。

評価基礎培地に、0-100 ng/mLのHGFを加えるか、AET-aMD4dY-PAS22を翻訳した無細胞翻訳液を当該培地に対して所定の倍率で希釈されるように加えるか、またはペプチドを翻訳していない無細胞翻訳液を同様の倍率で希釈されるように加え、その評価基礎培地を細胞に100 μL添加した。37 ℃、5% CO_2インキュベータ内で終夜培養することで細胞への刺激を行った。

シグナル強度の検出にはDual-Luciferase Reporter Assay System（Promega社）を使用した。100 μLの培地上清を除去し、Glo reagentを50 μL添加し、室温で10分細胞を溶解した。細胞の溶解液から発せられるFirefly luciferaseの発光をプレートリーダーで検出することで、HGF-Erk-SRE経路の活性化を定量した。続いて、50 μLのGlo & Stop reagent溶液を添加し、10分後に内部標準であるRenilla luciferaseの発光を検出し、細胞数の定量を行った。SRE activity = (Firefly luciferaseの発光強度)/(Renilla luciferaseの発光強度)として、各サンプルのシグナル活性を定量した。評価化合物を加えていないサンプルに対する相対的なシグナル活性値を求め、相対的受容体活性（Relative reporter activity）とした。

図６９に示す通り、無細胞翻訳MAET-aMD4dY-PAS22、MAET-aMD4dY-PAS8、MAET-aMD4-PAS22はMet活性化能を有することが明らかになった。

[0212] 実施例３８：無細胞発現EPO-PASダイマーペプチドの活性評価

EPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体のEpoR活性化能はPathHunter（登録商標） eXpress EpoR-JAK2 Functional Assay Kit（DiscoverX社）を用いて評価した。

96-wellプレートにPathHunter（登録商標） eXpress EpoR-JAK2 Functional Assay Kitに含まれるEPO活性評価用細胞を播種し、24時間37 ℃、5% CO_2下で培養を行った。細胞に対し、所定の濃度に希釈されたAET-EPO-PAS8、AET-E

PO-PAS49-b、またはAET-EPO-PAS100-bを翻訳した無細胞翻訳液を添加した。陰対照としては、ペプチドを翻訳していない無細胞翻訳液を、AET-EPO-PAS8、AET-EPO-PAS49、またはAET-EPO-PAS100を翻訳した無細胞翻訳液と同様の倍率で希釈したものを添加した。3時間室温で刺激した細胞に対し、調製したSubstrate Reagentを添加し、60分インキュベートした。化学発光強度をNivoプレートリーダー（Perkin Elmer社）で定量した。

図７０に示すように、全てのダイマーペプチドがEpoRを濃度依存的に活性化することが明らかになった。また、MAET-EPO-PAS8とMAET-EPO-PAS49-bはMAET-EPO-PAS100-bより高い活性を示した。このことから、49アミノ酸以下の短鎖PASリンカーを用いることで高い活性を有するダイマーペプチドが構築できることが明らかになった。

[0213] 実施例３９：無細胞発現VEGFR_D2-PASヘテロダイマーの活性評価

無細胞発現したVEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドのVEGF阻害能をルシフェラーゼアッセイによって評価した。40,000 cell/wellのVEGFR / NFAT Reporter HEK293細胞（BPS Bioscience社）を播種し、37 ℃、5% CO_2インキュベータ内で終夜インキュベートを行った。Assay medium（MEM培地（ナカライテスク社）、1x MEM Non-Essential Amino Acids Solution (Thermo Fisher Scientific社）、1 mM Sodium Pyruvate（ナカライテスク社)、1% Penicillin-Streptomycin (Sigma Aldrich社）、0.3% FBS （Thermo Fisher Scientific社））中で細胞を終夜インキュベートし、飢餓状態にした。Assay mediumに、10 ng/mLのヒトリコンビナントVEGF（R&D Systems）を100 μL添加し、さらに所定の希釈倍率でMAET-VEGFR_D2-PAS16、MAET-VEGFR_D2-PAS49-b、MAET-VEGFR_D2-PAS100-b、もしくはMAET-VEGFR_D2-GS16が含まれる無細胞発現液、またはペプチドを発現させていない無細胞発現液を添加し、そのAssay mediumを細胞に100 μL添加した。37 ℃、5% CO_2インキュベータ内で4時間培養することで細胞への刺激を行った。

シグナル強度の検出にはOne-Glo Luciferase Assay System (Promega社)を使用した。50 μLの培地上清を除去し、One-Glo reagentを50 μL添加し、

室温で10分細胞を溶解した。細胞の溶解液から発せられる発光をNivoプレートリーダー（Perkin Elmer社）で検出することでVEGFR-NFAT経路の活性化を定量し、評価化合物を加えていないサンプルに対する相対的なシグナル活性値を求め、相対的受容体活性（Relative reporter activity）とした。

図７１及び７２に示す通り、MAET-VEGFR_D2-PAS16、MAET-VEGFR_D2-PAS49-bはMAET-VEGFR_D2-PAS100-bに比べて高い阻害活性を示したことから、49アミノ酸以下の短鎖PASリンカーを用いることで高い活性を有するダイマーペプチドが構築できることが明らかになった。また、MAET-VEGFR_D2-PAS16はMAET-VEGFR_D2-GS16に対して高い阻害活性を示したことから、PASリンカーを用いることでGSリンカーに比して高い活性を有するダイマーペプチドが構築できることが明らかになった。

[0214] 実施例４０：HGF-PASトリマーペプチドの設計およびC. glutamicumにおけるその分泌発現

（４０－１）設計の概要

HGF-PASトリマーペプチドは、以下のように設計した。前記AET-aMD4dY-PAS22のC末端に、PASリンカーを介してさらにaMD4dY配列を結合させたペプチドを設計した。すなわち「第一のaMD4dY環状ペプチド」－「PASリンカー」－「第二のaMD4dY環状ペプチド」－「PASリンカー」－「第三のaMD4dY環状ペプチド」となるようペプチド配列を設計した。

[0215] （４０－２）HGF-PASトリマーペプチドの調製

調製したHGF-PASトリマーペプチドは以下のとおりである。

（Ｐ）AET-aMD4dY-PAS22-Trimer

AETCRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPGCRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPGCRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：１７２）

[0216] （４０－３）HGF-PASトリマーペプチドの発現

Corynex（登録商標）を用いて安定化HGF-PASトリマーペプチドの発現検討を行った。以下、Corynex（登録商標）による発現検討の実施例を記載する。

[0217] （４０－４）CspBシグナル配列を利用したAET-aMD4dY-PAS22-Trimer分泌発現

プラスミドの構築

安定化HGF-PASダイマーペプチドとして、上記（Ｐ）AET-aMD4dY-PAS22-Trimerのアミノ酸配列を設計し、このタンパク質をコードする塩基配列をC. glutamicumのコドン使用頻度を考慮して設計した。さらに、C. glutamicumによる分泌発現を可能とするよう、以下の発現カセットを設計した。

AET-aMD4dY-PAS22-Trimerは、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とAET-aMD4dY-PAS22-Trimerの融合タンパク質（以下、「CspBss-AET-aMD4dY-PAS22-Trimer」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-AET-aMD4dY-PAS22-Trimerをコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１７３、１７４に示す。

[0218] CspBss-AET-aMD4dY-PAS22-Trimerをコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagacctgccgccagttcaatcgccggacccacgaagtctggaat
ctggattgcggcgcagctcctgccgccccagcaccggctgcgccagctgctccagcgccggctgcccct
gcggcaccgggttgccgtcagtttaaccgccgtactcacgaggtttggaaccttgactgtggagcggct
cccgcagcaccagccccagccgcccctgctgcacccgcaccagcggcacccgccgctcctggctgtcgc
caattcaaccgacgcacccatgaagtgtggaacctcgattgctaa（配列番号：１７３）

CspBss-AET-aMD4dY-PAS22-Trimerのアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETCRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAAP
AAPGCRQFNRRTHEVWNLDCGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPGCRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：１７４）

[0219] CspBss-AET-aMD4dY-PAS22-Trimerに記載の塩基配列の上流にC. glutamicum ATCC13869株由来のcspB遺伝子のプロモーターを繋げ、さらに5’-側にKpnIサイト、3’-側にBamHIサイトを付加した、HGF-PASトリマーペプチドの発現カセットを設計し、全合成した。全合成したDNA断片（HGF-PASトリマーペプチドの発現カセット）を、特開平9-322774に記載のpPK4のKpnI-BamHI部位に挿入することによって、CspBシグナル配列を利用したHGF-PASトリマーペプチドの分泌発現プラスミドであるpPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS22-Trimerを構築

した。挿入断片の塩基配列決定の結果、設計通りのHGF-PASトリマーペプチドの発現カセットが構築されていることを確認した。塩基配列の決定はBigDye（登録商標）Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）と3500xL Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を用いて行った。

[0220] （４０－５）C. glutamicumにおけるHGF-PASトリマーペプチドの分泌発現

上記で構築したpPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS22-Trimerを用いてWO2016/171224に記載のC. glutamicum YDK010::phoS(W302C)株を形質転換し、YDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS22-Trimer株を得た。

得られた形質転換体を、25 mg/Lのカナマイシンを含むMMTG液体培地（グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3 g、硫酸アンモニウム 30 g、リン酸二水素カリウム 1.5 g、硫酸鉄七水和物 0.03 g、硫酸マンガン五水和物 0.03 g、チアミン塩酸塩 0.45 mg、ビオチン 0.45 mg、DL-メチオニン 0.15 g、大豆塩酸加水分解液（全窒素量 0.2 g）、炭酸カルシウム 50 g、水で1LにしてpH7.0に調整）でそれぞれ30℃、72時間培養した。

培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清6.5 μLをNuPAGE（登録商標）12% Bis-Tirs Gel（Thermo Fisher Scientific）を用いて還元SDS-PAGEに供してからQuick-CBB（Wako）にて染色を行った。その結果、YDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS22-Trimer株の培養上清中にAET-aMD4dY-PAS22-Trimerと推定されるタンパク質バンドが検出された（図７３、レーン２～５）。

また、上記と同様の方法で得たYDK010::phoS(W302C)/pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS22株を、上記と同様に培養し、その培養上清中にAET-aMD4dY-PAS22と推定されるタンパク質バンド（図７３、レーン６）が検出された。

[0221] 実施例４１：HGF-PASトリマーペプチドの分子量分析

実施例４０における培養後の、AET-aMD4dY-PAS22-Trimerの菌体ろ過液について、LC-MS（Waters, LC-MS（Waters, ACQUITY UPLC/SQD2）を用いて分子量の測定を行った。分析条件は表２に記載のとおりである。図７４に示すとおり、分子内で3つのジスルフィド結合を形成している酸化型のダイマーペプチ

ドの分子量の理論値にほぼ同一の値が得られた。このことから、3つのジスルフィド結合を含む正しいアミノ酸配列のペプチドを発現できたことが確認された。

[0222] 実施例４２：HGF-PASトリマーペプチドの活性評価

HGF-PASトリマーペプチドのMet活性化能をルシフェラーゼアッセイによって評価した。Opti-MEM培地（Thermo Fisher Scientific社）25 μLに対し、0.6 μLのAttractene Transfection Reagent（QIAGEN社）を添加し、室温で5分インキュベートを行った。上記混合溶液に対し、Opti-MEM 25 μLと1 μLのSRE reporter vector（QIAGEN社）の混合溶液を加え、室温で20分インキュベートを行った。この混合溶液を96-well plateに添加し、その上から40,000 cell/wellのHEK293E細胞を播種し、37 ℃、5% CO_2インキュベータ内で終夜インキュベートを行った。トランスフェクション後、培養上清を全て除去し、0.5% FBS（Thermo Fisher Scientific社）、1% 非必須アミノ酸溶液（Thermo Fisher Scientific社）およびペニシリン－ストレプトマイシン（ナカライテスク社）を含むOpti-MEM培地（評価基礎培地）を100 μL添加し、37 ℃で4時間培養することで、細胞を飢餓状態にした。

評価基礎培地に、0-100 ng/mLのHGFを加えるか、またはAET-aMD4dY-PAS22もしくはAET-aMD4dY-PAS22-Trimerを含む培養上清を当該培地に対して所定の倍率で希釈されるように加え、その評価基礎培地を細胞に100 μL添加した。37 ℃、5% CO_2インキュベータ内で終夜培養することで細胞への刺激を行った。

シグナル強度の検出にはDual-Luciferase Reporter Assay System（Promega社）を使用した。100 μLの培地上清を除去し、Glo reagentを50 μL添加し、室温で10分細胞を溶解した。細胞の溶解液から発せられるFirefly luciferaseの発光をプレートリーダーで検出することで、HGF-Erk-SRE経路の活性化を定量した。続いて、50 μLのGlo & Stop reagent溶液を添加し、10分後に内部標準であるRenilla luciferaseの発光を検出し、細胞数の定量を行った。SRE activity = (Firefly luciferaseの発光強度)/(Renilla luciferaseの

発光強度)として、各サンプルのシグナル活性を定量した。評価化合物を加えていないサンプルに対する相対的なシグナル活性値を求め、相対的受容体活性（Relative reporter activity）とした。

図７５に示す通り、HGF-PASトリマーペプチド（AET-aMD4dY-PAS22-Trimer）はダイマーペプチド（AET-aMD4dY-PAS22）と同様にシグナル活性化能を有することが明らかになった。

[0223] 実施例４３：HGF-PASダイマーペプチドとモノマーペプチドの活性比較

HGF-PASダイマーペプチドとモノマーペプチドのMet活性化能をルシフェラーゼアッセイによって比較した。Opti-MEM培地（Thermo Fisher Scientific社）25 μLに対し、0.6 μLのAttractene Transfection Reagent（QIAGEN社）を添加し、室温で5分インキュベートを行った。上記混合溶液に対し、Opti-MEM 25 μLと1 μLのSRE reporter vector（QIAGEN社）の混合溶液を加え、室温で20分インキュベートを行った。この混合溶液を96-well plateに添加し、その上から40,000 cell/wellのHEK293E細胞を播種し、37 ℃、5% CO_2インキュベータ内で終夜インキュベートを行った。トランスフェクション後、培養上清を全て除去し、0.5% FBS（Thermo Fisher Scientific社）、1% 非必須アミノ酸溶液（Thermo Fisher Scientific社）およびペニシリン－ストレプトマイシン（ナカライテスク社）を含むOpti-MEM培地（評価基礎培地）を100 μL添加し、37 ℃で4時間培養することで、細胞を飢餓状態にした。

評価基礎培地に、0-100 ng/mLのHGFを加えるか、または所定濃度でAET-aMD4dY-PAS22またはaMD4dYモノマーペプチド（CRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：２）、ジェンスクリプトジャパン株式会社で合成）を加え、細胞に100 μL添加した。37 ℃、5% CO_2インキュベータ内で終夜培養することで細胞への刺激を行った。

シグナル強度の検出にはDual-Luciferase Reporter Assay System（Promega社）を使用した。100 μLの培地上清を除去し、Glo reagentを50 μL添加し、室温で10分細胞を溶解した。細胞の溶解液から発せられるFirefly luciferaseの発光をプレートリーダーで検出することで、HGF-Erk-SRE経路の活性化

を定量した。続いて、50 μLのGlo & Stop reagent溶液を添加し、10分後に内部標準であるRenilla luciferaseの発光を検出し、細胞数の定量を行った。SRE activity = (Firefly luciferaseの発光強度)/(Renilla luciferaseの発光強度)として、各サンプルのシグナル活性を定量した。評価化合物を加えていないサンプルに対する相対的なシグナル活性値を求め、相対的受容体活性（Relative reporter activity）とした。

図７６に示す通り、HGFとダイマーペプチド（AET-aMD4dY-PAS22）はシグナル活性化能を示したのに対し、モノマーペプチド（aMD4dY）はシグナル活性化能を示さなかった。この結果より、ペプチドがダイマー化によりシグナル活性化能を獲得したことが明らかになった。

[0224] 実施例４４：VEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドリンカー改変体の設計およびC. glutamicumにおけるその分泌発現

（４４－１）リンカー改変体の設計の概要

AET-VEGFR_D2-PAS16は、第一のVEGFR結合配列（P-3）と第二のVEGFR結合配列（P-4）の間を16アミノ酸からなるPASリンカーで結合した構造を有している。このPASリンカーの長さを変えることで、VEGFR結合活性が変わることが予想される。そこで、PASリンカー部位を49アミノ酸または100アミノ酸のPAS反復配列に変えたリンカー改変体を設計した。

また、フレキシブルリンカーとしてはPASリンカーの他にグリシンとセリンの繰り返し配列であるGSリンカーも知られている。そこで、グリシン4残基とセリン1残基（GGGGS）の繰り返し配列からなるGSリンカーのN末端およびC末端にVEGFR結合環状ペプチドを結合させたリンカー改変体、すなわち「第一のVEGFR結合配列（P-3）」－「GSリンカー」－「第二のVEGFR結合配列（P-4）」となるようペプチド配列を設計した。すなわち、P-3のC末端とPASリンカーのN末端が、P-4のN末端とPASリンカーのC末端がそれぞれアミド結合で結合されており、一本のポリペプチド鎖として発現可能である。

[0225] （４４－２）VEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドリンカー改変体の調製

調製したVEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドリンカー改変体は以下のと

おりである。

（Ｑ）AET-VEGFR_D2-PAS49

AETAGPTWCEDDWYYCWLFGTAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAP

AVCWEDSWGGEVCWLFGT（配列番号：１７５）

（Ｒ）AET-VEGFR_D2-PAS49-b

AETAGPTWCEDDWYYCWLFGTSAPSPSSAPASASAPASPASASASASPASSPASASSASPAASSASPAS

SVCWEDSWGGEVCWLFGT（配列番号：１７６）

（Ｓ）AET-VEGFR_D2-PAS100

AETAGPTWCEDDWYYCWLFGTAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAP

AAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAVCWEDSWGGEVCWLFGT

（配列番号：１７７）

（Ｔ）AET-VEGFR_D2-PAS100-b

AETAGPTWCEDDWYYCWLFGTSAPSPSSAPASASAPASPASASASASPASSPASASSASPAASSASPAS

SSASPSAPAAPSASAAPSASPASSSPAPASAPSPAAAASSPSPAPSSASSAAVCWEDSWGGEVCWLFGT

（配列番号：１７８）

（Ｕ）AET-VEGFR_D2-GS16

AETAGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGGSGGGGSGGGGSGVCWEDSWGGEVCWLFGT（配列番号：１７９）

[0226] （４４－３）VEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドリンカー改変体の発現

Corynex（登録商標）を用いてVEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドリンカー改変体の発現検討を行った。以下、Corynex（登録商標）による発現検討の実施例を記載する。

[0227] （４４－４）CspBシグナル配列を利用したAET-VEGFR_D2-PAS49、AET-VEGFR_D2-PAS49-b、AET-VEGFR_D2-PAS100、AET-VEGFR_D2-PAS100-b、およびAET-VEGFR_D2-GS16の各分泌発現プラスミドの構築

VEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドリンカー改変体として、上記（Ｑ）AET-VEGFR_D2-PAS49（以下、「AET-VEGFR_D2-PAS49」と表記することがあり、単に「VEGFR_D2-PAS49」と表記することがある。）、（Ｒ）AET-VEGFR_D2-PA

S49-b（以下、「AET-VEGFR_D2-PAS49-b」と表記することがあり、単に「VEGFR_D2-PAS49-b」と表記することがある。）、（Ｓ）AET-VEGFR_D2-PAS100（以下、「AET-VEGFR_D2-PAS100」と表記することがあり、単に「VEGFR_D2-PAS100」と表記することがある。）、（Ｔ）AET-VEGFR_D2-PAS100-b（以下、「AET-VEGFR_D2-PAS100-b」と表記することがあり、単に「VEGFR_D2-PAS100-b」と表記することがある。）、および（Ｕ）AET-VEGFR_D2-GS16（以下、「AET-VEGFR_D2-GS16」と表記することがあり、単に「VEGFR_D2-GS16」と表記することがある。）の5種類のアミノ酸配列をそれぞれ設計し、これらタンパク質をコードする塩基配列をC. glutamicumのコドン使用頻度を考慮して設計した。さらに、C. glutamicumによる分泌発現を可能とするよう、それぞれ以下の発現カセットを設計した。

VEGFR_D2-PAS49は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とVEGFR_D2-PAS49の融合タンパク質（以下、「CspBss-VEGFR_D2-PAS49」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-VEGFR_D2-PAS49をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１８０、１８１に示す。

[0228] CspBss-VEGFR_D2-PAS49をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagaccgctggccctacctggtgtgaggacgattggtactactgt
tggctctttggcaccgccgcccctgctgctcccgccccgccgcccctgccgcaccagctccagcagcc
ccagctgcaccagcaccagccgctccagcagctccagcaccagctgctccagcagcaccagccccagca
gctccagccgcaccagctcctgcggtttgctgggaggattcttggggcggcgaagtttgctggctcttt
ggcacctaa（配列番号：１８０）

CspBss-VEGFR_D2-PAS49のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETAGPTWCEDDWYYCWLFGTAAPAAPAPAAPAAPAPAA
PAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAVCWEDSWGGEVCWLFGT（配列番号：１８１）

[0229] VEGFR_D2-PAS49-bは、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とVEGFR_D2-PAS49-bの融合タンパク質（以下、「CspBs

s-VEGFR_D2-PAS49-b」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-VEGFR_D2-PAS49-bをコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１８２、１８３に示す。

[0230] CspBss-VEGFR_D2-PAS49-bをコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagaccgcaggacccacttggtgcgaagatgactggtactattgc
tggctctttggcacctcagcacccagcccatcctccgctccagcgtctgcgagcgctcctgcatcccca
gcctctgcctccgcatcggcatcaccggcttccagcccagcgtcggcatcgtcagcctctccggctgcc
tcctccgcttctcctgcgtcctccgtgtgttgggaggattcctggggtggtgaagtctgctggctgttc
ggcacctaa（配列番号：１８２）

CspBss-VEGFR_D2-PAS49-bのアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETAGPTWCEDDWYYCWLFGTSAPSPSSAPASASAPASP
ASASASASPASSPASASSASPAASSASPASSVCWEDSWGGEVCWLFGT（配列番号：１８３）

[0231] VEGFR_D2-PAS100は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とVEGFR_D2-PAS100の融合タンパク質（以下、「CspBss-VEGFR_D2-PAS100」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-VEGFR_D2-PAS100をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１８４、１８５に示す。

[0232] CspBss-VEGFR_D2-PAS100をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagaccgccggtccaacctggtgtgaggatgactggtactactgc
tggctctttggcaccgctgctcccgctgctcccgcccctgctgctccagctgccccagccccagctgcc
ccagctgctccagcaccagccgctccagctgccccagcaccagctgcaccagcagcaccagcaccagca
gctccagccgctccagccccagccgctccagcagcaccagccccagcagctccagctgcaccagctcca
gccgccccagcagcaccagctccagcagccccagcagctccagctccagccgcaccagctgctccagcc
ccagccgcaccagcagccccagctccagctgctcctgctgtctgttgggaggactcttggggcggcgaa
gtttgttggttgtttggcacctaa（配列番号：１８４）

CspBss-VEGFR_D2-PAS100のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETAGPTWCEDDWYYCWLFGTAAPAAPAPAAPAAPAPAA
PAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPA
PAAPAAPAPAAPAVCWEDSWGGEVCWLFGT（配列番号：１８５）

[0233] VEGFR_D2-PAS100-bは、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とVEGFR_D2-PAS100-bの融合タンパク質（以下、「CspBss-VEGFR_D2-PAS100-b」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-VEGFR_D2-PAS100-bをコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１８６、１８７に示す。

[0234] CspBss-VEGFR_D2-PAS100-bをコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc
gtagctatcccagcattcgctgcagagaccgccggacctacctggtgtgaggatgactggtactattgc
tggctcttcggcacttccgccccttcccccttccagcgcaccagcgagcgcttcggctccggcctcccca
gcgtccgcatctgcgtctgcatcccctgcgtcgtcacccgcttcagcctcctcagcctcccctgcggct
tcatccgcctcgcccgcatccagctccgcatcaccctctgcgccagcagctccatccgcttctgctgcc
ccatcggcctctccggcttccagctctcccgcaccggcatccgctccgagcccagcagcagctgcatcc
tccccatctccggcaccatcctcggcctctagcgcggctgtgtgctgggaagattcctggggtggtgaa
gtctgctggctgtttggcacctaa（配列番号：１８６）

CspBss-VEGFR_D2-PAS100-bのアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETAGPTWCEDDWYYCWLFGTSAPSPSSAPASASAPASP
ASASASASPASSPASASSASPAASSASPASSSASPSAPAAPSASAAPSASPASSSPAPASAPSPAAAAS
SPSPAPSSASSAAVCWEDSWGGEVCWLFGT（配列番号：１８７）

[0235] VEGFR_D2-GS16は、C. glutamicum ATCC13869株由来のCspBのシグナルペプチド30アミノ酸残基とVEGFR_D2-GS16の融合タンパク質（以下、「CspBss-VEGFR_D2-GS16」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspBss-VEGFR_D2-GS16をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１８８、１８９に示す。

[0236] CspBss-VEGFR_D2-GS16をコードする塩基配列

atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggc

gtagctatcccagcattcgctgcagagaccgcgggtccgacctggtgtgaggatgactggtactactgt
tggttgttcggcaccggcggcggcggctccggcggcggcggctctggcggcggcggctctggcgtttgt
tgggaggactcttggggcggcgaagtttgctggctgtttggcacctaa（配列番号：１８８）

CspBss-VEGFR_D2-GS16のアミノ酸配列

MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPAFAAETAGPTWCEDDWYYCWLFGTGGGGSGGGGSGGGGSGVC
WEDSWGGEVCWLFGT（配列番号：１８９）

[0237] CspBss-VEGFR_D2-PAS49、CspBss-VEGFR_D2-PAS49-b、CspBss-VEGFR_D2-PAS100、CspBss-VEGFR_D2-PAS100-b、およびCspBss-VEGFR_D2-GS16に記載の塩基配列の上流にC. glutamicum ATCC13869株由来のcspB遺伝子のプロモーターを繋げ、さらに5’-側にKpnIサイト、3’-側にBamHIサイトを付加した、各VEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドリンカー改変体の発現カセットを設計し、全合成した。全合成したDNA断片（VEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドリンカー改変体の発現カセット）を、特開平9-322774に記載のpPK4のKpnI-BamHI部位に挿入することによって、CspBシグナル配列を利用した各VEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドリンカー改変体の分泌発現プラスミドであるpPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS49、pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS49-b、pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS100、pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS100-b、およびpPK4_CspBss-VEGFR_D2-GS16をそれぞれ構築した。挿入断片の塩基配列決定の結果、それぞれ設計通りのVEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドリンカー改変体の発現カセットが構築されていることを確認した。塩基配列の決定はBigDye（登録商標）Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) と3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。

[0238] （４４－５）C. glutamicumにおける各VEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドリンカー改変体の分泌発現

上記で構築したpPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS49、pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS49-b、pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS100、pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS100-b、およびpPK4_CspBss-VEGFR_D2-GS16を用いて、WO2016/171224に記載のC. glutamicum YDK0107株を形質転換し、YDK0107/pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS49株、YDK01

07/pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS49-b株、YDK0107/pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS100株、YDK0107/pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS100-b株、およびYDK0107/pPK4_CspBss-VEGFR_D2-GS16株を得た。

得られた各形質転換体を、25 mg/Lのカナマイシンを含むMMTG液体培地（グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3 g、硫酸アンモニウム 30 g、リン酸二水素カリウム 1.5 g、硫酸鉄七水和物 0.03 g、硫酸マンガン五水和物 0.03 g、チアミン塩酸塩 0.45 mg、ビオチン 0.45 mg、DL-メチオニン 0.15 g、大豆塩酸加水分解液（全窒素量 0.2 g）、炭酸カルシウム 50 g、水で1 Lにしてp H7.0に調整）でそれぞれ30℃、72時間培養した。

培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清6.5 μLをNuPAGE（登録商標）12% Bis-Tirs Gel（Thermo Fisher Scientific）を用いて還元SDS-PAGEに供してからQuick-CBB（Wako）にて染色を行った。その結果、YDK0107/pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS49株の培養上清中にVEGFR_D2-PAS49と推定されるタンパク質バンド（図７７、レーン２～５）、YDK0107/pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS49-b株の培養上清中にVEGFR_D2-PAS49-bと推定されるタンパク質バンド（図７７、レーン６～９）、YDK0107/pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS100株の培養上清中にVEGFR_D2-PAS100と推定されるタンパク質バンド（図７７、レーン１０～１３）、YDK0107/pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS100-b株の培養上清中にVEGFR_D2-PAS100-bと推定されるタンパク質バンド（図７７、レーン１４～１７）、およびYDK0107/pPK4_CspBss-VEGFR_D2-GS16株の培養上清中にVEGFR_D2-GS16と推定されるタンパク質バンド（図７７、レーン１８～２１）がそれぞれ検出された。

[0239] 実施例４５：VEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドリンカー改変体の分子量分析

実施例４４における培養後の、VEGFR_D2-PASヘテロダイマー改変体を発現させた菌体ろ過液について、菌体ろ過した後にLC-MS（Waters, ACQUITY UPLC/SQD2）を用いて分子量の測定を行った。分析条件は表５に記載のとおりである。図７８～８１に示すとおり、分子内で2つのジスルフィド結合を形成して

いる酸化型の各ダイマーペプチドの分子量の理論値にほぼ同一の値が得られた。このことから、2つのジスルフィド結合を含む正しいアミノ酸配列のペプチドを発現できたことが確認された。

[0240] 実施例４６：VEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドリンカー改変体の活性評価

VEGFR_D2-PASヘテロダイマーペプチドリンカー改変体のVEGF阻害能をルシフェラーゼアッセイによって評価した。40,000 cell/wellのVEGFR / NFAT Reporter HEK293細胞（BPS Bioscience社）を播種し、37 ℃、5% CO2インキュベータ内で終夜インキュベートを行った。Assay medium（MEM培地（ナカライテスク社）、1x MEM Non-Essential Amino Acids Solution (Thermo Fisher Scientific社）、1 mM Sodium Pyruvate（ナカライテスク社)、1% Penicillin-Streptomycin (Sigma Aldrich社）、0.3% FBS （Thermo Fisher Scientific社））中で細胞を終夜インキュベートし、飢餓状態にした。Assay mediumに、10 ng/mLのヒトリコンビナントVEGF（R&D Systems）を添加し、さらに所定の濃度でVEGFR_D2-PAS16、VEGFR_D2-PAS49、VEGFR_D2-PAS100を含む培養上清を添加し、そのAssay mediumを細胞に100 μL添加した。37 ℃、5% CO_2インキュベータ内で4時間培養することで細胞への刺激を行った。なお、VEGFR_D2-PAS16は実施例２７に記載の方法に従い得たものである。

シグナル強度の検出にはOne-Glo Luciferase Assay System (Promega社)を使用した。50 μLの培地上清を除去し、One-Glo reagentを50 μL添加し、室温で10分細胞を溶解した。細胞の溶解液から発せられる発光をNivoプレートリーダー（Perkin Elmer社）で検出することでVEGFR-NFAT経路の活性化を定量し、評価化合物を加えていないサンプルに対する相対的なシグナル活性値を求め、相対的受容体活性（Relative reporter activity）とした。

評価結果を図８２及び８３に、各ペプチドダイマーのIC50値を算出した結果を下記表８に示す。VEGFR_D2-PAS16はVEGFR_D2-GS16に対して高い阻害活性を示した。また、VEGFR_D2-PAS16とVEGFR_D2-PAS49はVEGFR_D2-PAS100に対して高い阻害活性を示したことから、PASリンカーを用いることでGSリンカーに

比して高い阻害活性を有し、49アミノ酸以下のPASリンカーを用いることで高い阻害活性を有するダイマーペプチドが開発できることが明らかになった。

[0241] [表8]

ペプチド	IC50 (g/L)
AET-VEGFR_D2-PAS16	1.5 x 10^{-6}
AET-VEGFR_D2-GS16	1.6 x 10^{-5}
AET-VEGFR_D2-PAS49	1.2 x 10^{-5}
AET-VEGFR_D2-PAS100	8.6 x 10^{-5}

[0242] 実施例４７：TPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の設計およびC. glutamicumにおけるその分泌発現

（４７－１）リンカー改変体の設計の概要

トロンボポエチン様活性を有するTPO2-PAS8は、第一のAF12285ペプチドと第二の第一のAF12285ペプチドの間を8アミノ酸からなるPASリンカーで結合した構造を有している。このPASリンカーの長さを変えることで、トロンボポエチン様活性が変わることが予想される。そこで、PASリンカー部位を49アミノ酸または100アミノ酸のPAS反復配列に変えたリンカー改変体を設計した。

また、フレキシブルリンカーとしてはPASリンカーの他にグリシンとセリンの繰り返し配列であるGSリンカーも知られている。そこで、グリシン4残基とセリン1残基（GGGGS）の繰り返し配列からなるGSリンカーのN末端およびC末端にEPO環状ペプチドを結合させたリンカー改変体、すなわち「第一のAF12285ペプチド」－「GSリンカー」－「第一のAF12285ペプチド」となるようペプチド配列を設計した。

[0243] （４７－２）TPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の調製

調製したTPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体は以下のとおりである。

（Ｖ）TPO2-PAS49

GGCADGPTLREWISFCGGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAGG

CADGPTLREWISFCGG（配列番号：１９０）

（Ｗ）TPO2-PAS49-b

GGCADGPTLREWISFCGGSAPSPSSAPASASAPASPASASASASPASSPASASSASPAASSASPASSGG

CADGPTLREWISFCGG（配列番号：１９１）

（Ｘ）TPO2-PAS100

GGCADGPTLREWISFCGGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAP

AAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAGGCADGPTLREWISFCGG（

配列番号：１９２）

（Ｙ）TPO2-PAS100-b

GGCADGPTLREWISFCGGSAPSPSSAPASASAPASPASASASASPASSPASASSASPAASSASPASSSA

SPSAPAAPSASAAPSASPASSSPAPASAPSPAAAASSPSPAPSSASSAAGGCADGPTLREWISFCGG（

配列番号：１９３）

（Ｚ）TPO2-GS8

GGCADGPTLREWISFCGGGGGSGGGGGCADGPTLREWISFCGG（配列番号：１９４）

[0244]（４７－３）TPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の発現

Corynex（登録商標）を用いてこれらのTPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の発現検討を行った。以下、Corynex（登録商標）による発現検討の実施例を記載する。

[0245]（４７－４）CspAシグナル配列を利用したTPO2-PAS49、TPO2-PAS49-b、TPO2-PAS100、TPO2-PAS100-b、およびTPO2-GS8の各分泌発現プラスミドの構築

TPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体として、上記（Ｖ）TPO2-PAS49（以下、「TPO2-PAS49」と表記することがある。）、（Ｗ）TPO2-PAS49-b（以下、「TPO2-PAS49-b」と表記することがある。）、（Ｘ）TPO2-PAS100（以下、「TPO2-PAS100」と表記することがある。）、（Ｙ）TPO2-PAS100-b（以下、「TPO2-PAS100-b」と表記することがある。）、および（Ｚ）TPO2-GS8（以下、「TPO2-GS8」と表記することがある。）の5種類のアミノ酸配列をそれぞれ設計し、これらタンパク質をコードする塩基配列をC. glutamicumのコドン使用頻度を考慮して設計した。さらに、C. glutamicumによる分泌発現を可能とするよう、それぞれ以下の発現カセットを設計した。

TPO2-PAS49は、C. ammoniagenes ATCC6872株由来のCspAのシグナルペプチ

ド25アミノ酸残基とTP02-PAS49の融合タンパク質（以下、「CspAss-TP02-PAS49」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspAss-TP02-PAS49をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１９５、１９６に示す。

[0246] CspAss-TP02-PAS49をコードする塩基配列

atgaaacgcatgaaatcgctggctgcggcgctcaccgtcgctggggccatgctggccgcacctgtggca
acggcaggtggctgtgctgacggtcctacccttcgtgagtggatttcttttgcggcggtgctgctcct
gctgcccctgctcctgctgctcctgcagcaccagccccagcagctccagccgccccagctccagccgca
ccagctgccccagcaccagccgctccagcagcaccagctccagcagccccagctgcaccagccccagcg
ggcggttgtgctgacggtcctacccttcgtgagtggatttccttctgtggtggctaa（配列番号：
１９５）

CspAss-TP02-PAS49のアミノ酸配列

MKRMKSLAAALTVAGAMLAAPVATAGGCADGPTLREWISFCGGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAA
PAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAGGCADGPTLREWISFCGG（配列番号：１９６）

[0247] TP02-PAS49-bは、C. ammoniagenes ATCC6872株由来のCspAのシグナルペプチド25アミノ酸残基とTP02-PAS49-bの融合タンパク質（以下、「CspAss-TP02-PAS49-b」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspAss-TP02-PAS49-bをコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１９７、１９８に示す。

[0248] CspAss-TP02-PAS49-bをコードする塩基配列

atgaaacgcatgaaatcgctggctgcggcgctcaccgtcgctggggccatgctggccgcacctgtggca
acggcaggcgggtgtgcagacggacccactctgcgcgaatggatctcctttgcggcggttccgctccg
tcgccatcctctgctccggcatccgcgtctgcgccagcatccccagccagcgcttcagcctcagcgtcc
cctgcctcctctccagcatccgccagcagcgcatctcctgcggctagctcggcatcacccgcttcgtcc
ggaggttgcgctgatggccctaccctccgtgagtggatttccttctgcggtggctaa（配列番号：
１９７）

CspAss-TP02-PAS49-bのアミノ酸配列

MKRMKSLAAALTVAGAMLAAPVATAGGCADGPTLREWISFCGGSAPSPSSAPASASAPASPASASASAS

PASSPASASSASPAASSASPASSGGCADGPTLREWISFCGG（配列番号：１９８）

[0249] TPO2-PAS100は、C. ammoniagenes ATCC6872株由来のCspAのシグナルペプチド25アミノ酸残基とTPO2-PAS100の融合タンパク質（以下、「CspAss-TPO2-PAS100」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspAss-TPO2-PAS100をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：１９９、２００に示す。

[0250] CspAss-TPO2-PAS100をコードする塩基配列

atgaaacgcatgaaatcgctggctgcggcgctcaccgtcgctggggccatgctggccgcacctgtggca
acggcaggcggttgtgctgacggtcctaccttgcgtgaatggatttctttctgtggtggtgcggctccg
gctgctccggctcctgcggctccggctgcaccagcaccagccgcaccagctgcaccagccccagctgca
ccagccgctccagcaccagctgccccagctgcaccagctccagccgcaccagcagccccagctccagca
gccccagcagctccagcaccagccgctccagctgccccagcaccagctgctccagcagctccagcacca
gcagctccagctgctccagccccagccgccccagccgctccagccccagcagcaccagccgccccagct
ccagccgccccagcaggtggctgtgctgatggtcctaccttcgtgaatggatttccttttgtggcggt
tag（配列番号：１９９）

CspAss-TPO2-PAS100のアミノ酸配列

MKRMKSLAAALTVAGAMLAAPVATAGGCADGPTLREWISFCGGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAA
PAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPA
PAAPAGGCADGPTLREWISFCGG（配列番号：２００）

[0251] TPO2-PAS100-bは、C. ammoniagenes ATCC6872株由来のCspAのシグナルペプチド25アミノ酸残基とTPO2-PAS100の融合タンパク質（以下、「CspAss-TPO2-PAS100-b」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspAss-TPO2-PAS100-bをコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：２０１、２０２に示す。

[0252] CspAss-TPO2-PAS100-bをコードする塩基配列

atgaaacgcatgaaatcgctggctgcggcgctcaccgtcgctggggccatgctggccgcacctgtggca
acggcaggcgggtgtgcagacggtcccactctccgcgaatggatctcctttgcggcggaagcgcgccc
tccccgtcatctgcccctgcatctgcgtccgcaccagcatccccagcctctgcgtctgcttctgcatca

ccggcctcgtccccagcaagcgcatcgtccgcgtcaccagctgcgtcctcagcctcccctgcttcctcg
tccgcttcgccttcggctcctgccgctccctctgcatccgctgccccatccgcctcaccagccagctcc
tctccggcaccagcgtccgctccttcccctgcagctgcggcgagctctccaagcccggctccctcctcc
gcatccagcgctgccggtggatgcgcagatggcccgaccctgcgtgagtggattagcttctgcggcggt
taa（配列番号：２０１）

CspAss-TP02-PAS100-bのアミノ酸配列

MKRMKSLAAALTVAGAMLAAPVATAGGCADGPTLREWISFCGGSAPSPSSAPASASAPASPASASASAS
PASSPASASSASPAASSASPASSSASPSAPAAPSASAAPSASPASSSPAPASAPSPAAAASSPSPAPSS
ASSAAGGCADGPTLREWISFCGG（配列番号：２０２）

[0253] TP02-GS8は、C. ammoniagenes ATCC6872株由来のCspAのシグナルペプチド25アミノ酸残基とTP02-GS8の融合タンパク質（以下、「CspAss-TP02-GS8」と表記する。）として分泌発現させた。設計したCspAss-TP02-GS8をコードする塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号：２０３、２０４に示す。

[0254] CspAss-TP02-GS8をコードする塩基配列

atgaaacgcatgaaatcgctggctgcggcgctcaccgtcgctggggccatgctggccgcacctgtggca
acggcaggtggctgtgcggatggtcctaccttgcgtgagtggatttctttctgtggcggtggtggtggt
ggttctggtggtggtggtggttgcgcagatggcccaaccctgcgcgaatggatctccttctgcggcggc
taa（配列番号：２０３）

CspAss-TP02-GS8のアミノ酸配列

MKRMKSLAAALTVAGAMLAAPVATAGGCADGPTLREWISFCGGGGGGSGGGGGCADGPTLREWISFCGG
（配列番号：２０４）

[0255] CspAss-TP02-PAS49、CspAss-TP02-PAS49-b、CspAss-TP02-PAS100、CspAss-TP02-PAS100-b、およびCspAss-TP02-GS8に記載の塩基配列の上流にC. glutamicum ATCC13869株由来のcspB遺伝子のプロモーターを繋げ、さらに5’-側にKpnIサイト、3’-側にBamHIサイトを付加した、各TP0-PASダイマーペプチドリンカー改変体の発現カセットを設計し、全合成した。全合成したDNA断片（TP0-PASダイマーペプチドリンカー改変体の発現カセット）を、特開平9-322774

に記載のpPK4のKpnI-BamHI部位に挿入することによって、CspAシグナル配列を利用した各TPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の分泌発現プラスミドであるpPK4_CspAss-TPO2-PAS49、pPK4_CspAss-TPO2-PAS49-b、pPK4_CspAss-TPO2-PAS100、pPK4_CspAss-TPO2-PAS100-b、およびpPK4_CspAss-TPO2-GS8をそれぞれ構築した。挿入断片の塩基配列決定の結果、それぞれ設計通りのTPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の発現カセットが構築されていることを確認した。塩基配列の決定はBigDye（登録商標）Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）と3500xL Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を用いて行った。

[0256] （４７－５）C. glutamicumにおける各TPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の分泌発現

上記で構築したpPK4_CspAss-TPO2-PAS49、pPK4_CspAss-TPO2-PAS49-b、pPK4_CspAss-TPO2-PAS100、pPK4_CspAss-TPO2-PAS100-b、およびpPK4_CspAss-TPO2-GS8を用いて、WO2016/171224に記載のC. glutamicum YDK0107株を形質転換し、YDK0107/pPK4_CspAss-TPO2-PAS49株、YDK0107/pPK4_CspAss-TPO2-PAS49-b株、YDK0107/pPK4_CspAss-TPO2-PAS100株、YDK0107/pPK4_CspAss-TPO2-PAS100-b株、およびYDK0107/pPK4_CspAss-TPO2-GS8株を得た。

得られた各形質転換体を、25 mg/Lのカナマイシンを含むMMTG液体培地（グルコース 120 g、硫酸マグネシウム七水和物 3 g、硫酸アンモニウム 30 g、リン酸二水素カリウム 1.5 g、硫酸鉄七水和物 0.03 g、硫酸マンガン五水和物 0.03 g、チアミン塩酸塩 0.45 mg、ビオチン 0.45 mg、DL-メチオニン 0.15 g、大豆塩酸加水分解液（全窒素量 0.2 g）、炭酸カルシウム 50 g、水で1 Lにしてp H7.0に調整）でそれぞれ30℃、72時間培養した。

培養終了後、各培養液を遠心分離して得られた培養上清6.5 μLをNuPAGE（登録商標）12% Bis-Tirs Gel（Thermo Fisher Scientific）を用いて還元SDS-PAGEに供してからQuick-CBB（Wako）にて染色を行った。その結果、YDK0107/pPK4_CspAss-TPO2-PAS49株の培養上清中にTPO2-PAS49と推定されるタンパク質バンド（図８４、レーン２～５）、YDK0107/pPK4_CspAss-TPO2-PAS49-b株

の培養上清中にTPO2-PAS49-bと推定されるタンパク質バンド（図８４、レーン６～９）、YDK0107/pPK4_CspAss-TPO2-PAS100株の培養上清中にTPO2-PAS100と推定されるタンパク質バンド（図８４、レーン１０～１３）、YDK0107/pPK4_CspAss-TPO2-PAS49-b株の培養上清中にTPO2-PAS49-bと推定されるタンパク質バンド（図８４、レーン１４～１７）、およびYDK0107/pPK4_CspAss-TPO2-GS8株の培養上清中にTPO2-GS8と推定されるタンパク質バンド（図８４、レーン１８～２１）がそれぞれ検出された。

[0257] 実施例４８：TPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の分子量分析

実施例４７における培養後の、TPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の菌体ろ過液について、LC-MS (Waters, LC-MS (Waters, ACQUITY UPLC/SQD2)を用いて分子量の測定を行った。分析条件は表２に記載のとおりである。図８５～８９に示すとおり、分子内で2つのジスルフィド結合を形成している酸化型の各ダイマーペプチドの分子量の理論値にほぼ同一の値が得られた。このことから、2つのジスルフィド結合を含む正しいアミノ酸配列のペプチドを発現できたことが確認された。

[0258] 実施例４９：TPO-PASダイマーペプチドリンカー改変体の活性評価

TPO-PASダイマーペプチド改変体のトロンボポエチン様活性はヒト白血病由来血球細胞株であるHEL細胞のCREBリン酸化レベルの定量によって評価した。200,000 cellのHEL細胞をFBSを含まないRPMI1640培地（Thermo Fisher Scientific社）中で24時間培養し、飢餓状態にした。この細胞を、100 ng/mLのリコンビナントヒトTPO（rhTPO, Peprotech社)、またはTPO2-PAS8, TPO2-PAS49, TPO2-PAS100もしくはTPO2-GS8を終濃度20-40 ng/mLとなるように各ダイマーペプチドを含む培養上清を希釈して添加したRPMI1640培地で20分間刺激した。陰対照としてはPBSを加えて20分間刺激を行った（Mock群）。培地を除去し、PBSで一度細胞を洗浄した後、Protease inhibitor cocktail（ナカライテスク社）を添加したLysis buffer 17（R&D Systems社）を100 μL加えることで細胞を溶解した。溶解液を14,000 Gで5分間遠心し、上清をライセートとして得た。なお、TPO2-PAS8は実施例２３に記載の方法に従い得たものである

。

Phospho-CREB (Ser133) and Total CREB ELISA kit (RayBio社) を用い、ライセート中のリン酸化CREB (pCREB)レベルの定量を行った。各ライセートをAssay Diluentで25倍希釈し、CREB Pan CREB Microplateに100 μLずつ添加して4 ℃、一晩振とうした。Microplateを3度洗浄バッファーで洗浄した後、100 μLのPhospho Detection Antibody CREB (Ser133)を100 μL添加し37 ℃で30分静置することで抗原抗体反応を行った。さらにMicroplateを3度洗浄バッファーで洗浄した後、100 μLのanti-rabbit 抗体HRPコンジュゲートを100 μL添加し37 ℃で30分静置することで抗原抗体反応を行った。さらにMicroplateを3度洗浄バッファーで洗浄した後、100 μLのTMB溶液を添加し、室温で30 分間発色反応を行った。50 μLのStop溶液を添加し、マイクロプレートで450 nm波長の吸光度を測定することで、リン酸化レベルの定量を行った。

結果を図９０に示す。全てのダイマーペプチドを添加した群でMock群に比して高いpCREBレベルが確認された。TPO2-PAS8とTPO2-PAS49はそれぞれ136 %, 131 %とrhTPO刺激群（143%）に近いpCREBレベルを示したのに対し、TPO2-PAS100は112%と低いpCREBレベルであった。また、TPO2-GS8は121%とTPO2-PAS8に比して低いpCREBレベルであった。これらから、短鎖PASリンカーを用いることで長鎖PASリンカーやGSリンカーに比して高いアゴニスト活性が得られることが明らかになった。

請求の範囲

[請求項1] （I）第１の生理活性ペプチド部位と、

（II）４９個以下のアミノ酸残基からなるリンカー部位と、

（III）前記リンカー部位を介して前記第１の生理活性ペプチド部位とは反対側に位置する第２の生理活性ペプチド部位と

を含むペプチド分子であって、

前記第１の生理活性ペプチド部位と前記第２の生理活性ペプチド部位が、互いに同じであっても異なっていてもよく、

前記リンカー部位のアミノ酸配列の少なくとも９０％がアラニン（A）、プロリン（P）及びセリン（S）から選択されるアミノ酸残基からなる、前記ペプチド分子。

[請求項2] 前記第１の生理活性ペプチド部位が環状ペプチドを構成している、及び／又は前記第２の生理活性ペプチド部位が環状ペプチドを構成している、請求項１に記載のペプチド分子。

[請求項3] 前記第１の生理活性ペプチド部位が、ジスルフィド結合により環状構造が形成された環状ペプチドを構成している、及び／又は前記第２の生理活性ペプチド部位が、ジスルフィド結合により環状構造が形成された環状ペプチドを構成している、請求項１又は２に記載のペプチド分子。

[請求項4] 前記第１の生理活性ペプチド部位と前記第２の生理活性ペプチド部位が、それぞれ、c-Metタンパク質に結合する環状ペプチドを構成しており、互いに同じであっても異なっていてもよい、請求項１～３のいずれか１項に記載のペプチド分子。

[請求項5] 前記環状ペプチドが、以下の（a）～（i）から選択されるアミノ酸配列を含む、ジスルフィド結合により環状構造を形成している環状ペプチドである、請求項４に記載のペプチド分子。

（a）CYRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：１）；

（b）CRQFNRRTHEVWNLDC（配列番号：２）；

(c) CYWYYAWDQTYKAFPC（配列番号：３）；

(d) CWYYAWDQTYKAFPC（配列番号：４）；

(e) CYISWNEFNSPNWRFITC（配列番号：５）；

(f) CISWNEFNSPNWRFITC（配列番号：６）；

(g) （a）～（f）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の１又は２個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されており、かつc-Metタンパク質に結合するペプチド；

（h）（a）～（f）のいずれかのアミノ酸配列と90％以上の配列同一性を有し、但し両端のシステイン残基を有しているアミノ酸配列からなり、かつc-Metタンパク質に結合するペプチド；及び

（i）（a）～（h）のいずれかのアミノ酸配列において、両端のシステイン残基以外の少なくとも１つのアミノ酸が修飾されているペプチド（アミノ酸の修飾は、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニル化、ADPリボシル化又は糖鎖付加である。）

[請求項6] 前記第１の生理活性ペプチド部位と前記第２の生理活性ペプチド部位が、それぞれ、エリスロポエチン受容体に結合する環状ペプチドを構成しており、互いに同じであっても異なっていてもよい、請求項１～３のいずれか１項に記載のペプチド分子。

[請求項7] 前記環状ペプチドが、以下の（j）～（n）から選択されるアミノ酸配列を含む、ジスルフィド結合により環状構造を形成している環状ペプチドである、請求項６に記載のペプチド分子。

（j）GGLYACHMGPMTWVCQPLRG（配列番号：６５）；

（k）CISWNEFNSPNWRFITC（配列番号：６６）；

（l）（j）又は（k）のアミノ酸配列において、システイン残基以外の１又は２個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されており、かつエリスロポエチン受容体に結合するペプチド；

（m）（j）又は（k）のいずれかのアミノ酸配列と90％以上の配列同一性を有し、但しシステイン残基を（j）又は（k）におけるそのまま

の位置で有しているアミノ酸配列からなり、かつエリスロポエチン受容体に結合するペプチド；及び

（n）（j）～（m）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の少なくとも１つのアミノ酸が修飾されているペプチド（アミノ酸の修飾は、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニリル化、ADPリボシル化又は糖鎖付加である。）

[請求項8] 前記第１の生理活性ペプチド部位と前記第２の生理活性ペプチド部位が、それぞれ、トロンボポエチン受容体に結合する生理活性ペプチドからなり、互いに同じであっても異なっていてもよい、請求項１～３のいずれか１項に記載のペプチド分子。

[請求項9] 前記生理活性ペプチドが、以下の（o）～（u）から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項８に記載のペプチド分子。

（o）IEGPTLRQWLAARA（配列番号：６７）；

（p）GGCADGPTLREWISFCGG（配列番号：６８）；

（q）GGCTLREWLHGGFCGG（配列番号：６９）；

（r）LAIEGPTLRQWLHGNGRDT（配列番号：７０）；

（s）（o）～（r）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の１又は２個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されており、かつトロンボポエチン受容体に結合するペプチド；

（t）（o）～（r）のいずれかのアミノ酸配列と90％以上の配列同一性を有し、但し（p）又は（q）を基準とする場合にはシステイン残基を（p）又は（q）におけるそのままの位置で有しているアミノ酸配列からなり、かつトロンボポエチン受容体に結合するペプチド；及び

（u）（o）～（t）のいずれかのアミノ酸配列において、システイン残基以外の少なくとも１つのアミノ酸が修飾されているペプチド（アミノ酸の修飾は、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニリル化、ADPリボシル化又は糖鎖付加である。）

[請求項10] 前記リンカー部位（II）と隣接しない位置で、機能性修飾部位を更

に含む、請求項１～９のいずれか１項に記載のペプチド分子。

[請求項11] 前記リンカー部位（II）が第１のリンカー部位であり、

前記第２の生理活性ペプチド部位の、前記第１のリンカー部位とは反対側に第２のリンカー部位を更に含み、

前記第２のリンカー部位を介して前記第２の生理活性ペプチド部位とは反対側に位置する第３の生理活性ペプチド部位を更に含み、

前記第３の生理活性ペプチド部位が、前記第１の生理活性ペプチド部位及び／又は前記第２の生理活性ペプチド部位と同じであっても異なっていてもよく、

前記第２のリンカー部位が、４９個以下のアミノ酸残基からなり、そのアミノ酸配列の少なくとも９０％がアラニン（A）、プロリン（P）及びセリン（S）から選択されるアミノ酸残基からなり、前記第１のリンカー部位と同じであっても異なっていてもよい、請求項１～１０のいずれか１項に記載のペプチド分子。

[請求項12] 前記リンカー部位（II）が、AP、AAP、AS、ASP及びASSからなる群から選択されるアミノ酸配列を２つ以上繰り返して含み、かつ第２のリンカー部位が存在する場合には、当該第２のリンカー部位が、AP、AAP、AS、ASP及びASSからなる群から選択されるアミノ酸配列を２つ以上繰り返して含む、請求項１～１１のいずれか１項に記載のペプチド分子。

[請求項13] ペプチド分子の製造方法であって、

前記ペプチド分子をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞において前記ポリヌクレオチドを発現させること、又は前記ペプチド分子をコードするポリヌクレオチドを無細胞発現系において発現させることにより、前記ペプチド分子を生成する工程、

を含み、

前記ペプチド分子が、（I）第１の生理活性ペプチド部位と、（II）アミノ酸残基からなるリンカー部位と、（III）前記リンカー部位

を介して前記第１の生理活性ペプチド部位とは反対側に位置する、第２の生理活性ペプチド部位及び／又は少なくとも１つのアミノ酸残基からなる付加アミノ酸配列とを含み、

前記第１の生理活性ペプチド部位と前記第２の生理活性ペプチド部位が、それぞれ、分子量10,000以下であり、かつ５０個以下のアミノ酸残基からなり、互いに同じであっても異なっていてもよく、

前記付加アミノ酸配列が、分子量10,000以下であり、かつ５０個以下のアミノ酸残基からなる、前記製造方法。

[請求項14] 前記第１の生理活性ペプチド部位が環状ペプチドを構成している、及び／又は前記第２の生理活性ペプチド部位が環状ペプチドを構成している、請求項１３に記載の製造方法。

[請求項15] ペプチド分子の製造方法であって、

前記ペプチド分子をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞において前記ポリヌクレオチドを発現させること、又は前記ペプチド分子をコードするポリヌクレオチドを無細胞発現系において発現させることにより、前記ペプチド分子を生成する工程、

を含み、

前記ペプチド分子が、（I）環状ペプチドを構成している第１の生理活性ペプチド部位と、（II）アミノ酸残基からなるリンカー部位と、（III）前記リンカー部位を介して前記第１の生理活性ペプチド部位とは反対側に位置する、第２の生理活性ペプチド部位及び／又は少なくとも１つのアミノ酸残基からなる付加アミノ酸配列とを含み、

前記第１の生理活性ペプチド部位と前記第２の生理活性ペプチド部位が、互いに同じであっても異なっていてもよく、

前記付加アミノ酸配列が、分子量10,000以下であり、かつ５０個以下のアミノ酸残基からなる、前記製造方法。

[請求項16] 前記ペプチド分子が、前記第２の生理活性ペプチド部位を含み、かつ前記第２の生理活性ペプチド部位が、環状ペプチドを構成している

、請求項１５に記載の製造方法。

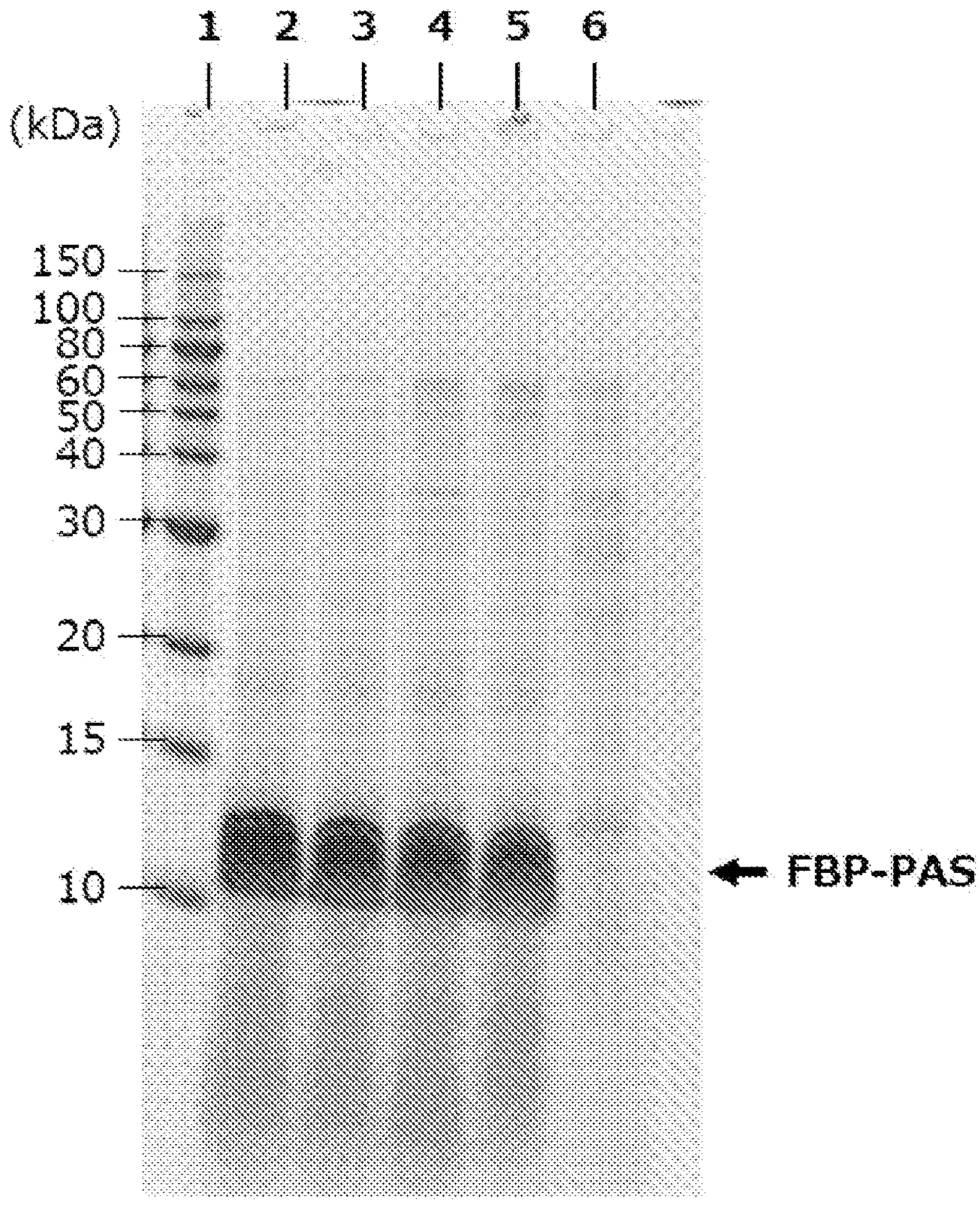
[請求項17] 前記リンカー部位が、分子量10,000以下であり、かつ５０個以下のアミノ酸残基からなる、請求項１３～１６のいずれか１項に記載の製造方法。

[請求項18] 前記リンカー部位が、分子量10,000以下であり、かつ４９個以下のアミノ酸残基からなるリンカー部位であって、そのアミノ酸配列の少なくとも９０％がアラニン（A）、プロリン（P）及びセリン（S）から選択されるアミノ酸残基からなる、請求項１３～１６のいずれか１項に記載の製造方法。

[請求項19] 前記リンカー部位が、AP、AAP、AS、ASP及びASSからなる群から選択されるアミノ酸配列を２つ以上繰り返して含む、請求項１３～１８のいずれか１項に記載の製造方法。

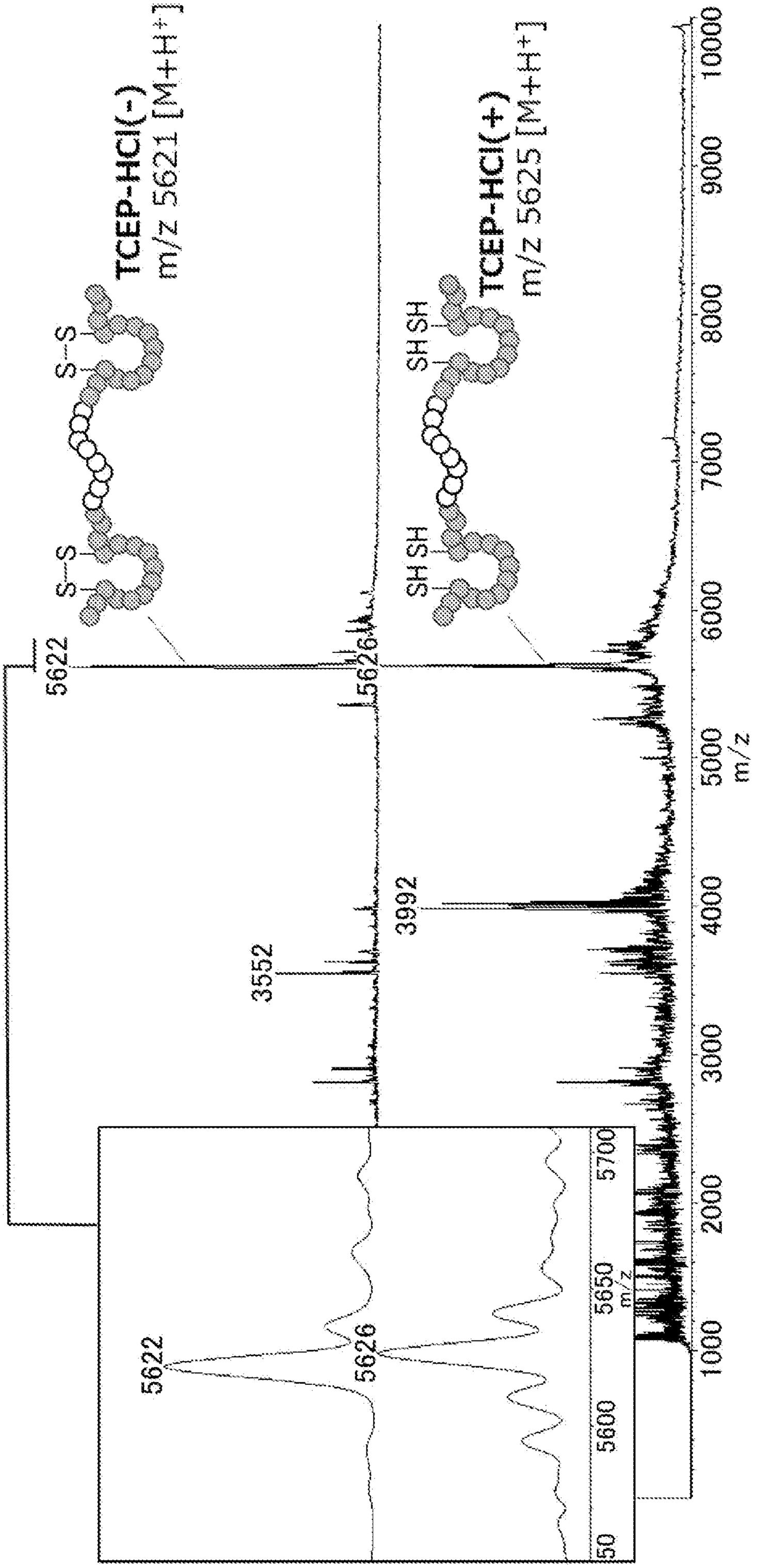
[図1]

FIG.1



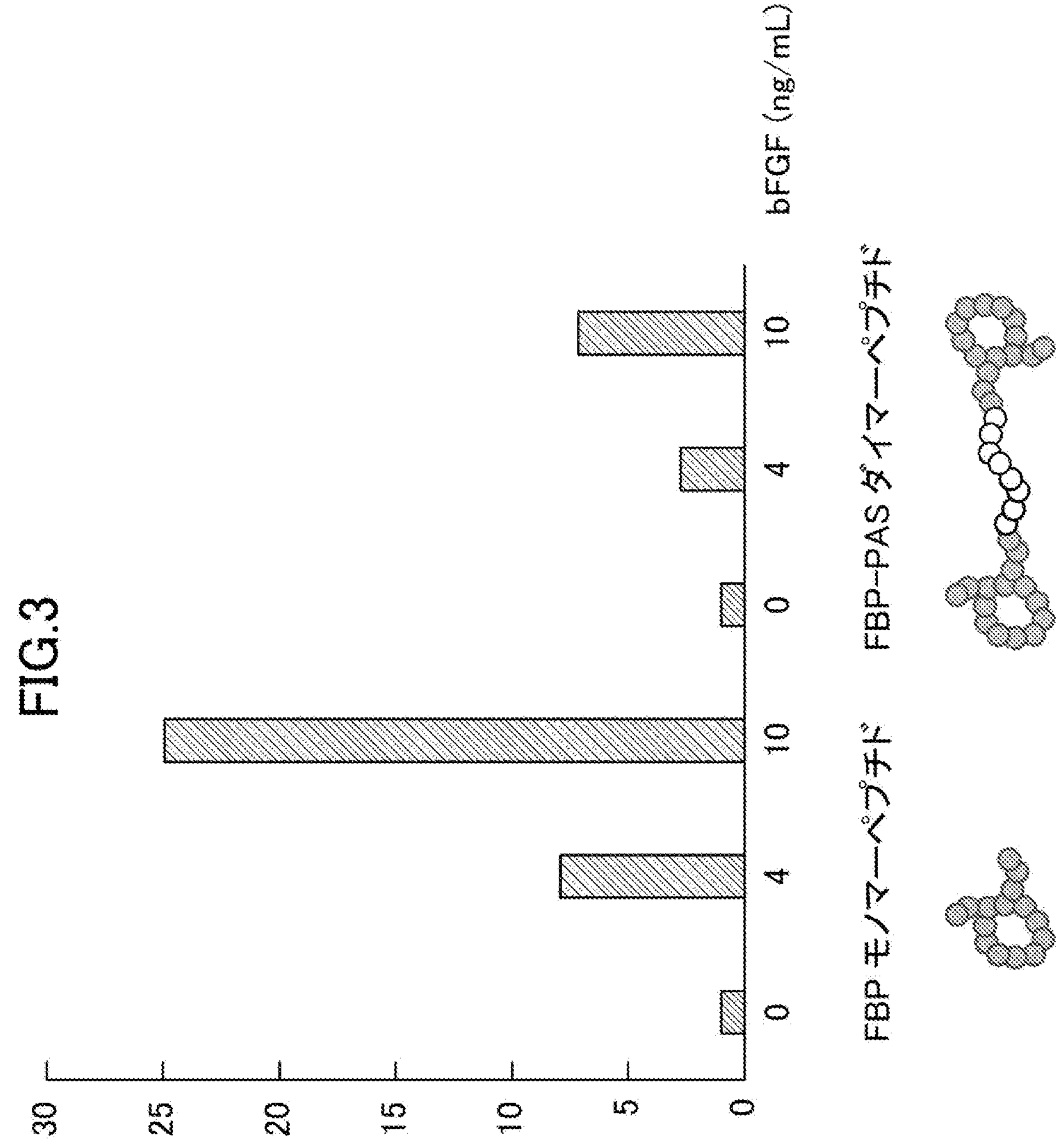
[図2]

FIG.2


TCEP-HCl(-)
m/z 5621 [M+H+]
TCEP-HCl(+)
m/z 5625 [M+H+]
S–S
SH SH
5622
5626
3552
3992
5700
5600
5650
m/z
5000
6000
7000
8000
9000
10000
4000
3000
2000
1000
50

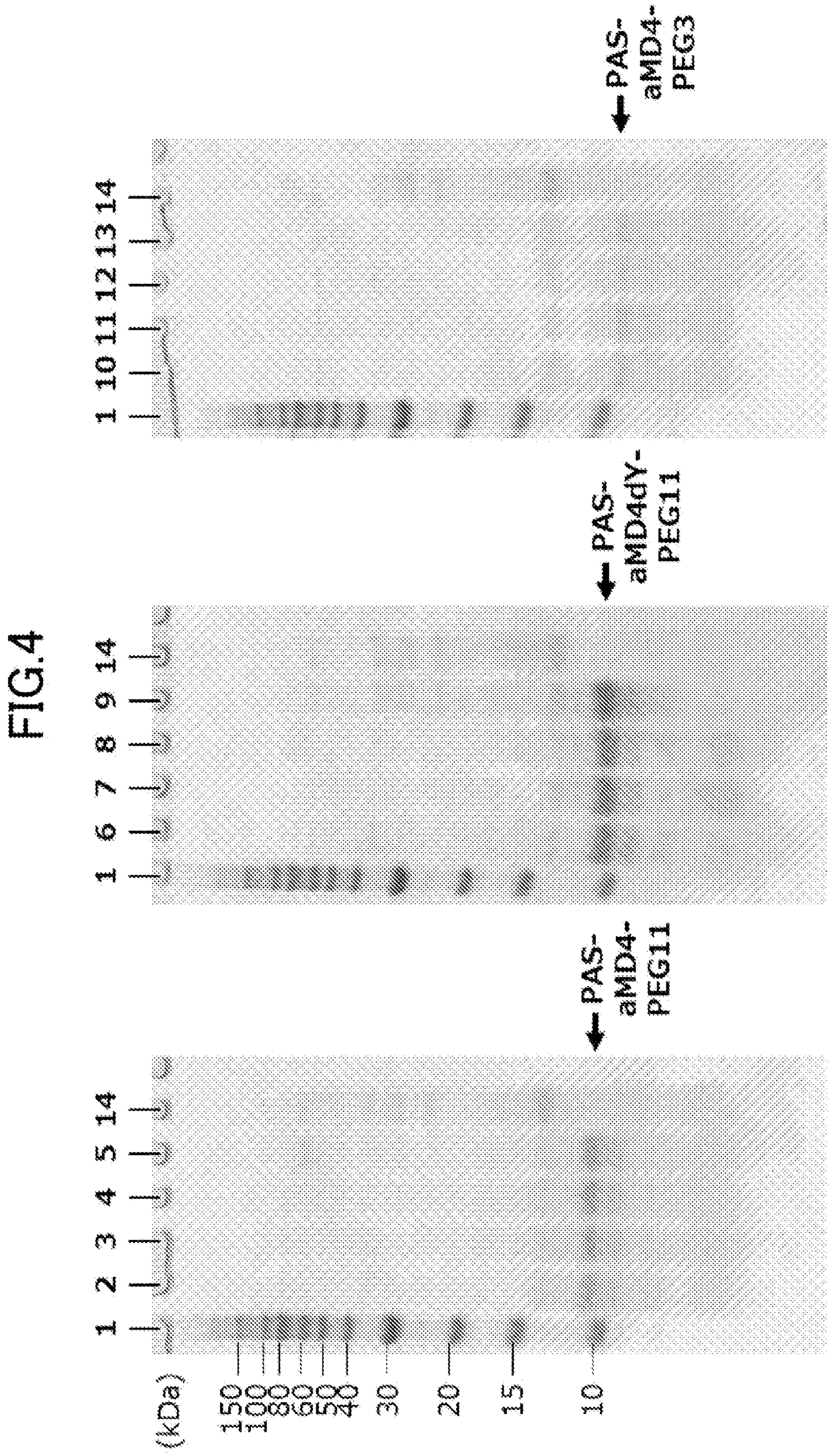
[図3]

FIG.3


Relative reporter activity
30
25
20
15
10
5
0
0
4
10
FBP モノマーペプチド
0
4
10
FBP-PAS ダイマーペプチド
bFGF (ng/mL)

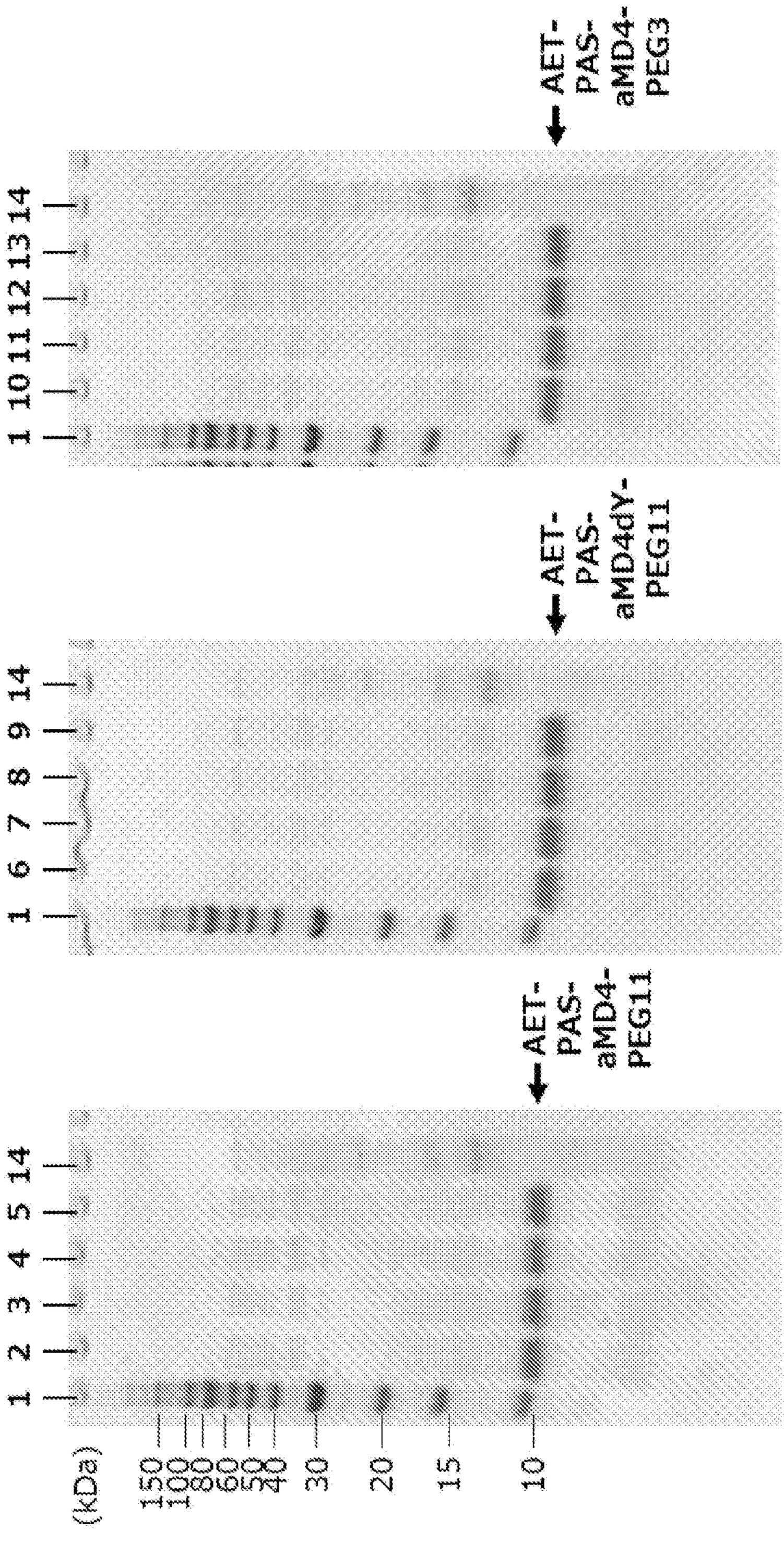
[図4]

FIG.4


PAS-aMD4-PEG3
1 10 11 12 13 14
PAS-aMD4dY-PEG11
1 6 7 8 9 14
PAS-aMD4-PEG11
1 2 3 4 5 14
(kDa)
150
100
80
60
50
40
30
20
15
10

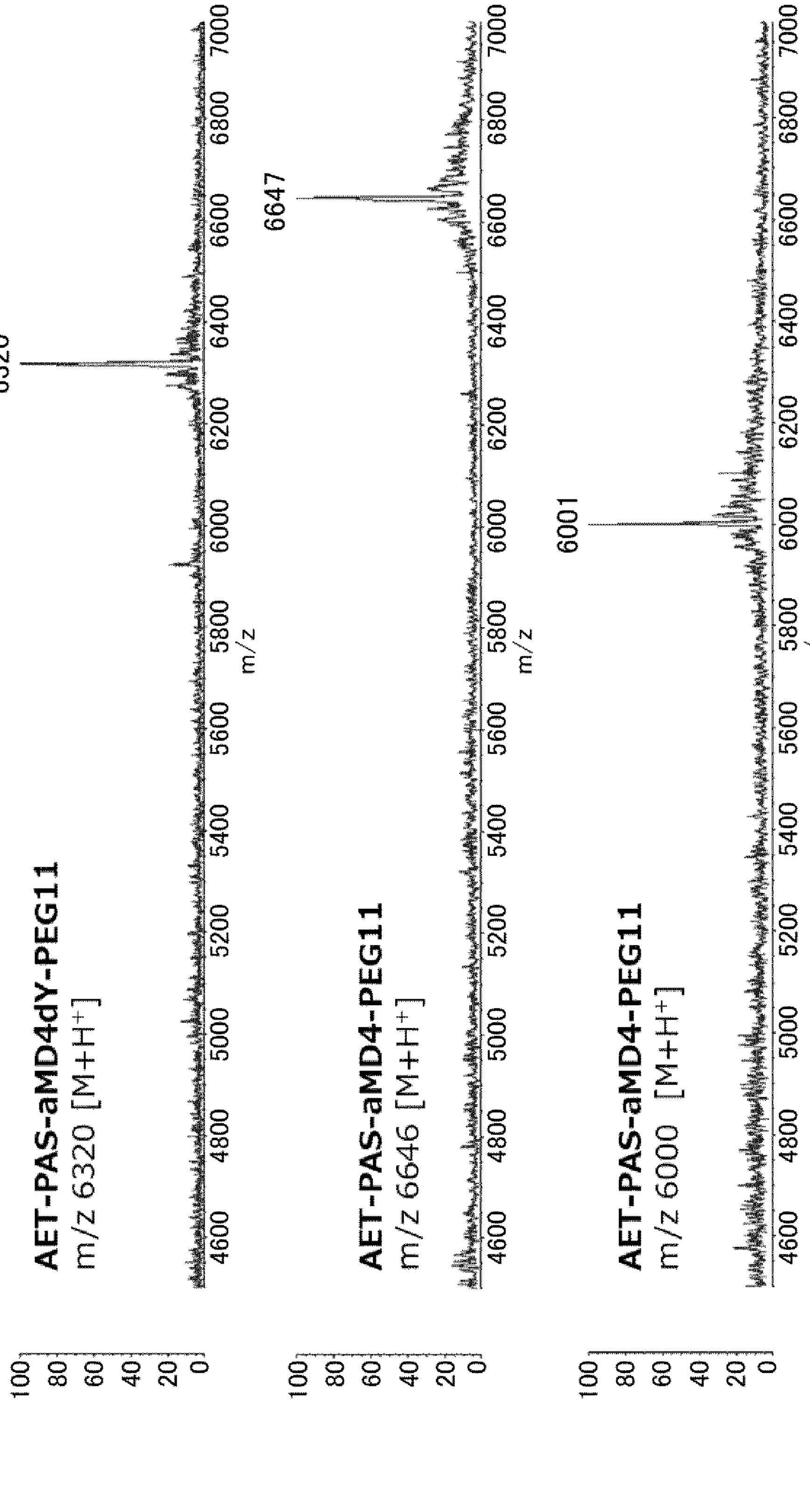
[図5]

FIG.5


AET-PAS-aMD4-PEG3
1 10 11 12 13 14
AET-PAS-aMD4dY-PEG11
1 6 7 8 9 14
AET-PAS-aMD4-PEG11
1 2 3 4 5 14
(kDa)
110
80
60
50
40
30
20
15
10

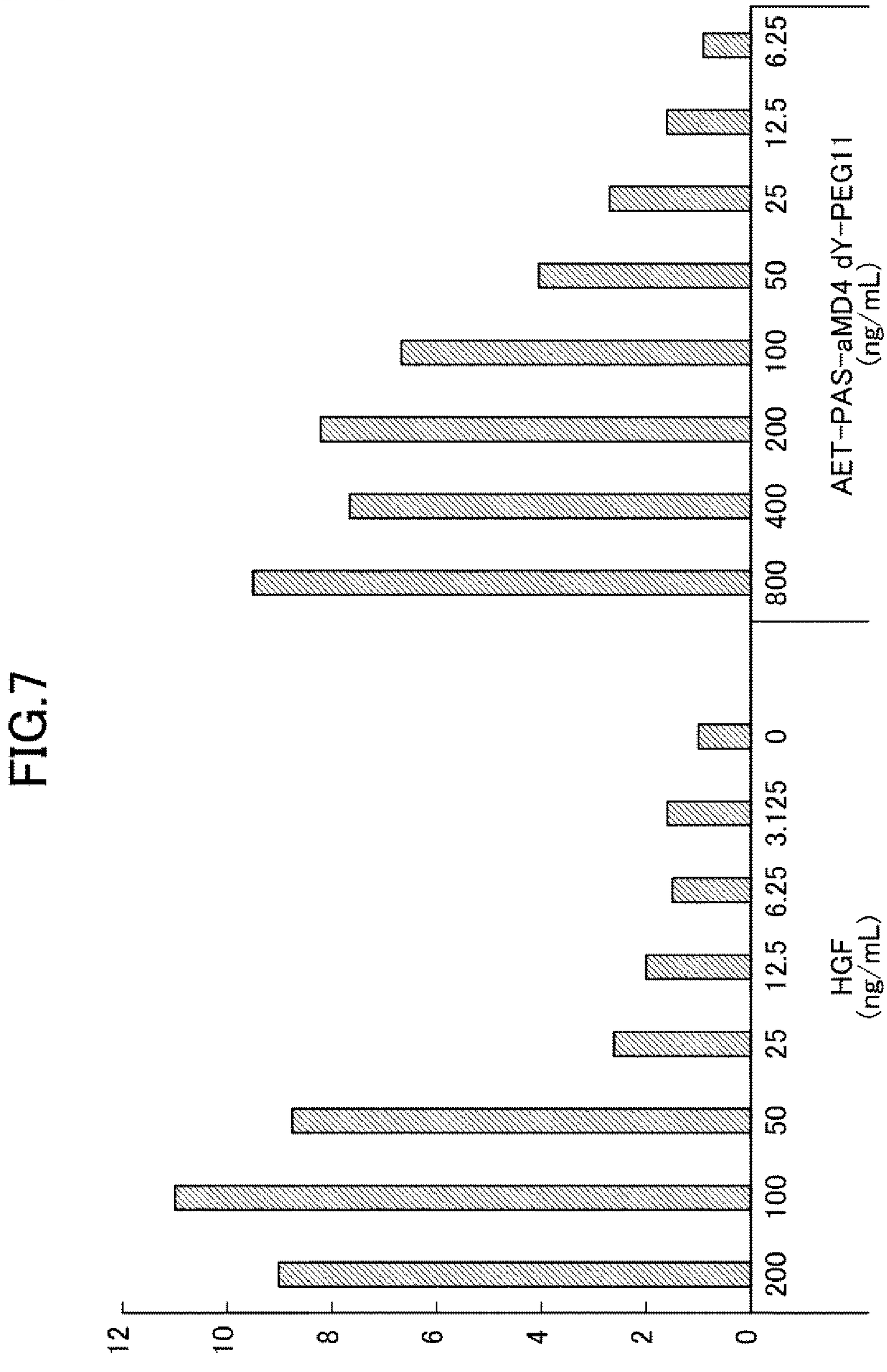
[図6]

FIG.6


AET-PAS-aMD4dY-PEG11
m/z 6320 [M+H+]
6320
AET-PAS-aMD4-PEG11
m/z 6646 [M+H+]
6647
AET-PAS-aMD4-PEG11
m/z 6000 [M-H+]
6001
m/z
Intensity
100
80
60
40
20
0
4600
4800
5000
5200
5400
5600
5800
6000
6200
6400
6600
6800
7000

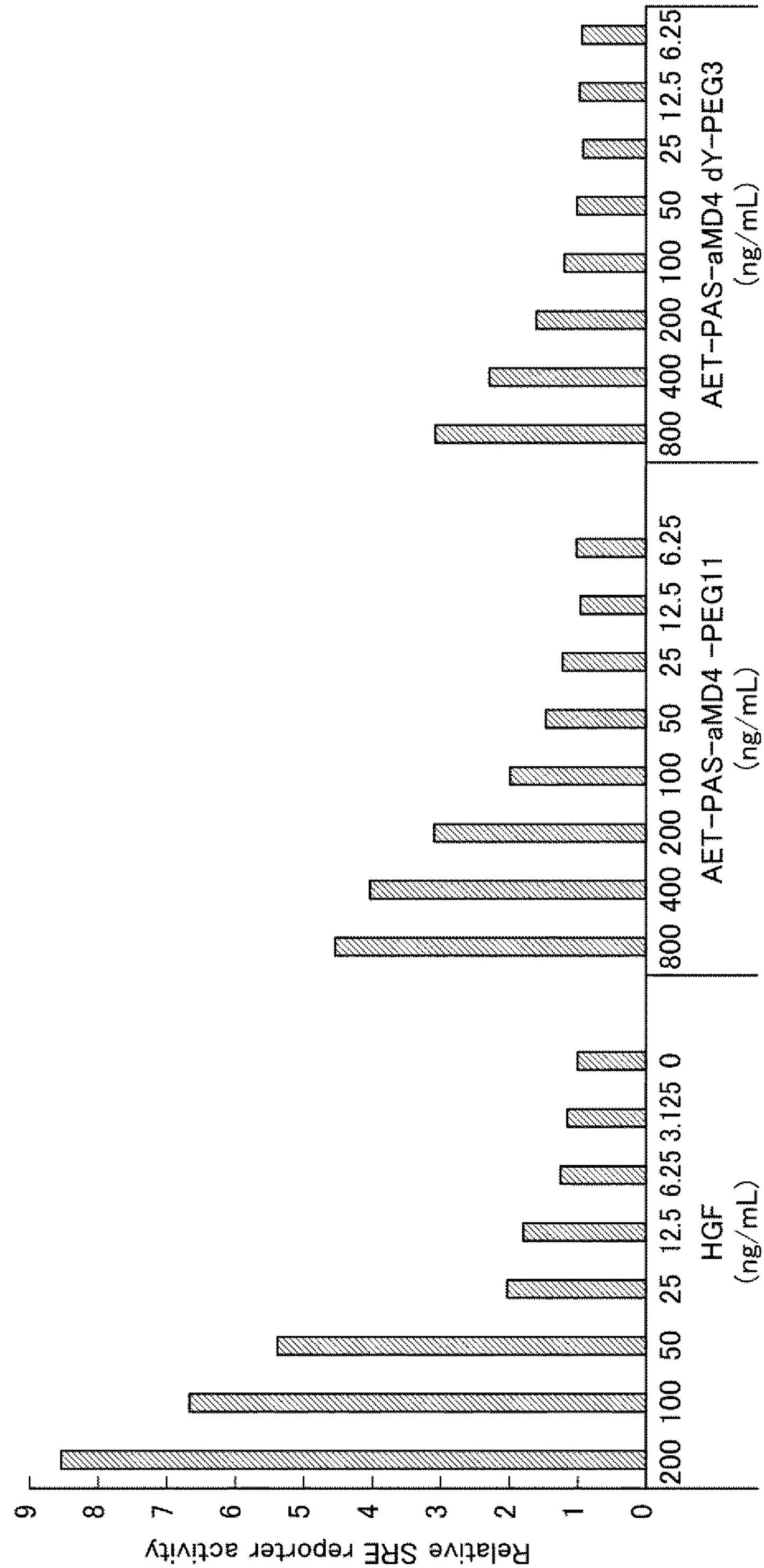
[図7]

FIG.7


Relative SRE reporter activity
0
2
4
6
8
10
12
HGF (ng/mL)
200
100
50
25
12.5
6.25
3.125
0
AET-PAS-aMD4 dY-PEG11 (ng/mL)
800
400
200
100
50
25
12.5
6.25

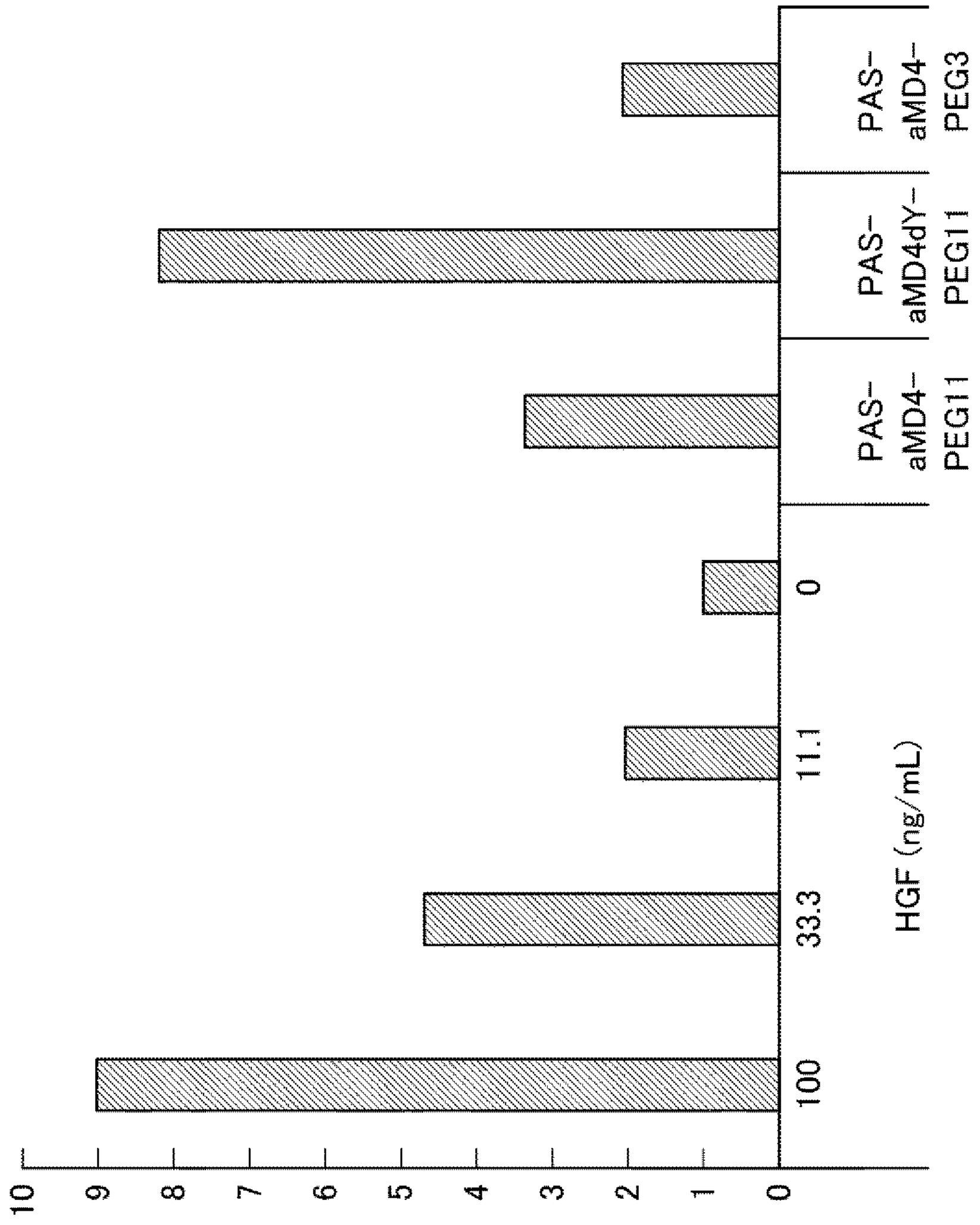
[図8]

FIG.8


Relative SRE reporter activity
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
200 100 50 25 12.5 6.25 3.125 0
HGF
(ng/mL)
200 100 50 25 12.5 6.25 0
AET-PAS-aMD4 -PEG11
(ng/mL)
800 400 200 100 50 25 12.5 6.25
AET-PAS-aMD4 dY-PEG3
(ng/mL)
800 400 200 100 50 25 12.5 6.25
AET-PAS-aMD4 dY-PEG3
(ng/mL)

[図9]

FIG.9


PAS-aMD4-PEG3
PAS-aMD4dY-PEG11
PAS-aMD4-PEG11
0
11.1
33.3
100
HGF (ng/mL)
Relative SRE reporter activity
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

[図10]

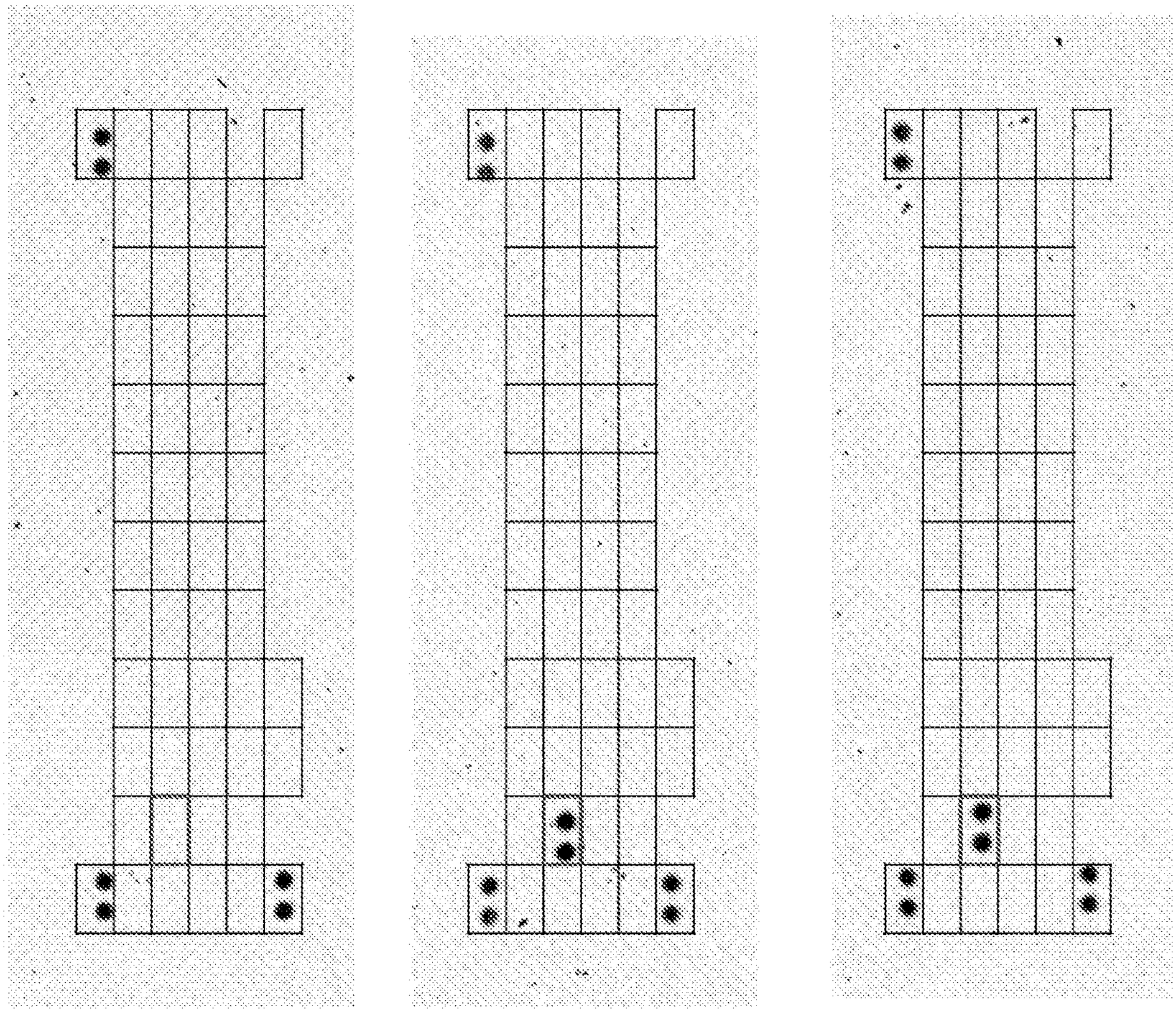


FIG.10

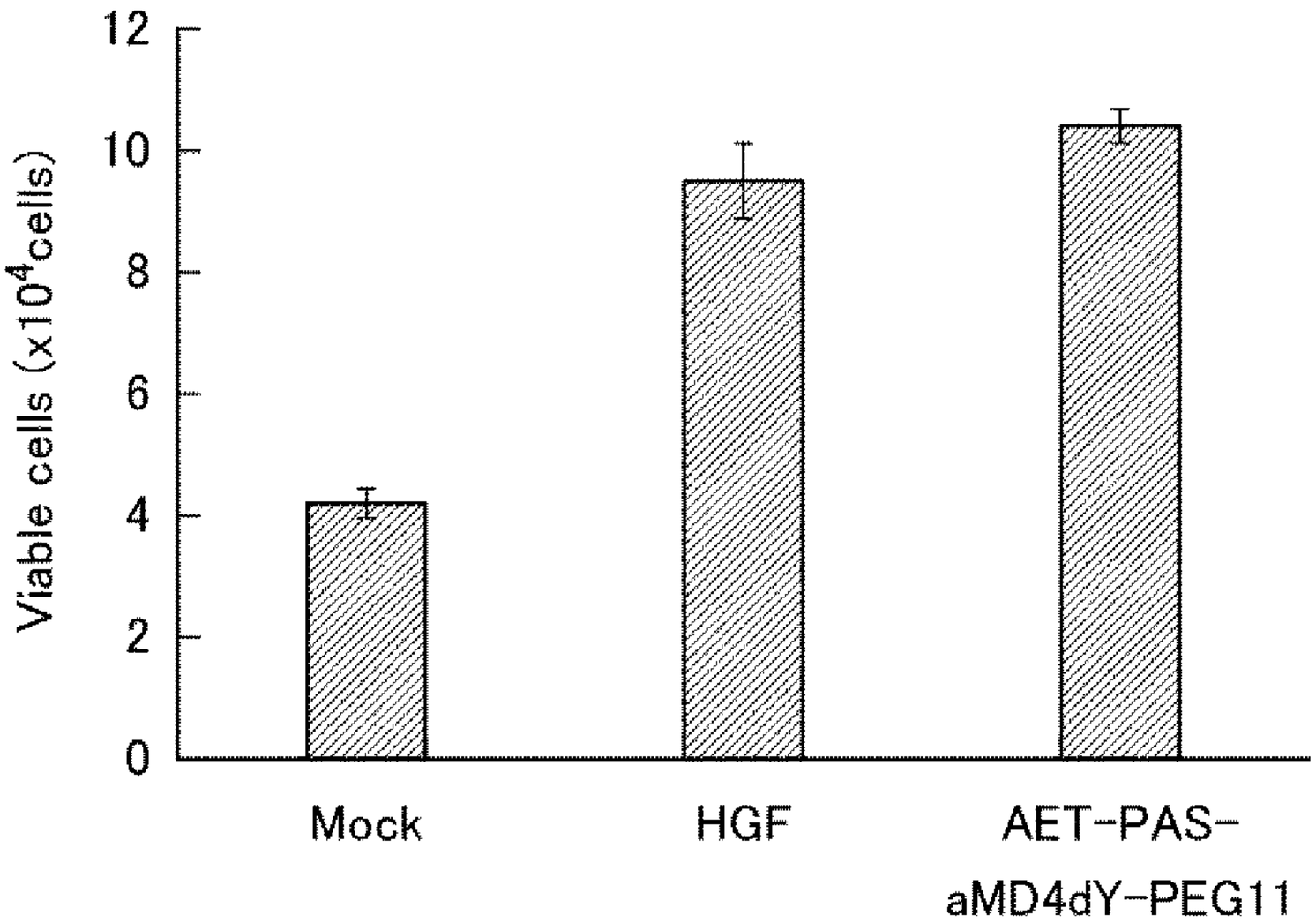
[図11]

FIG.11

Pos ctrl	Dtk	Tie−1	EphA4		Neg ctrl						
	Axl	POR2	EphA3	EphA10							
FGFR3	FGFR4	Ins R	IGF−IR								
Flt−3	M−CSFR	c−Ret	POR1								
VEGFR3	MuSK	EphA1	EphA2								
ALK	DDR1	DDR2	EphA5								
FGFR2 α	FGFR1										
SCFR	PDGFR β										
VEGFR2	VEGFR1										
EphB6	EphB4										
ErbB4	FGFR3										
PDGFR α	Flt−3										
TrkC	VEGFR3										
EphB2	ALK										
RYK	DDR1										
ErbB3	MuSK										
MSPR	EphA1										
TrkB	EphA2										
EphB1	EphA5										
EphB3	EphB6										
ErbB2	EphB4										
Met	EphA7										
TrkA											
EphA7											
Pos ctrl	EGFR	Mer	Tie−2	EphA6	Pos ctrl						

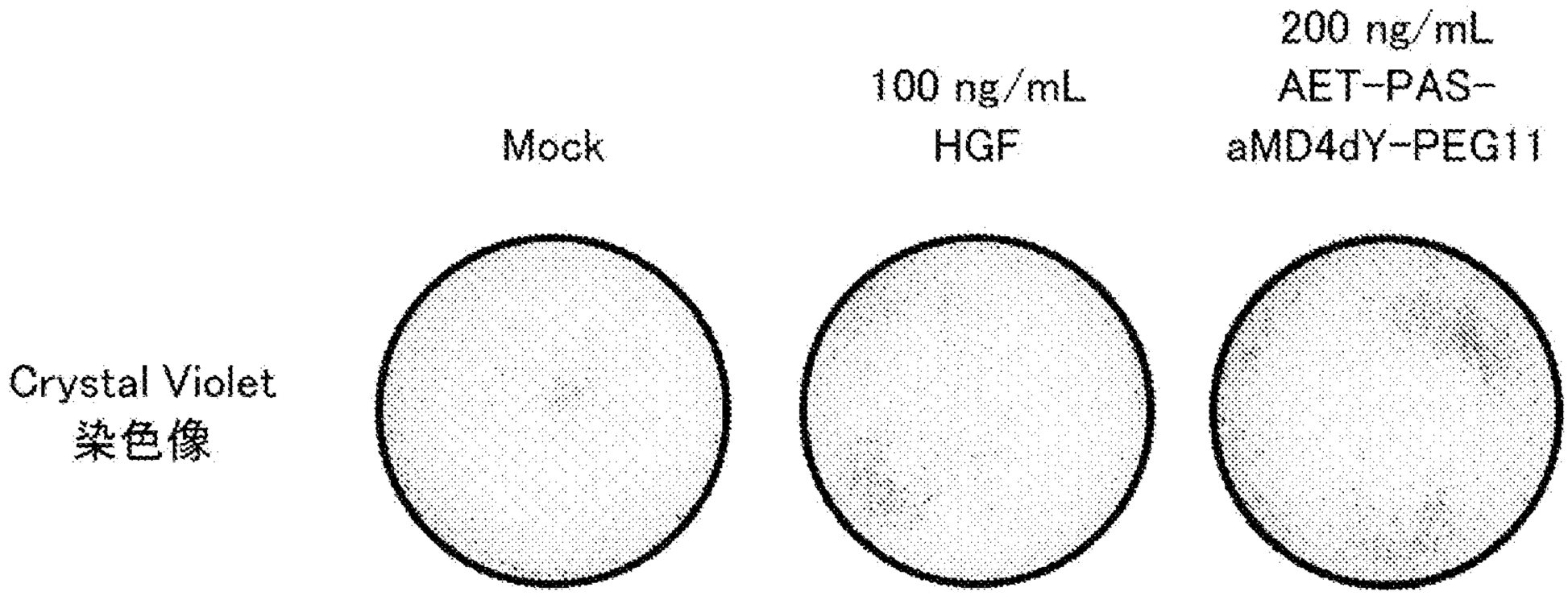
[図12]

FIG.12



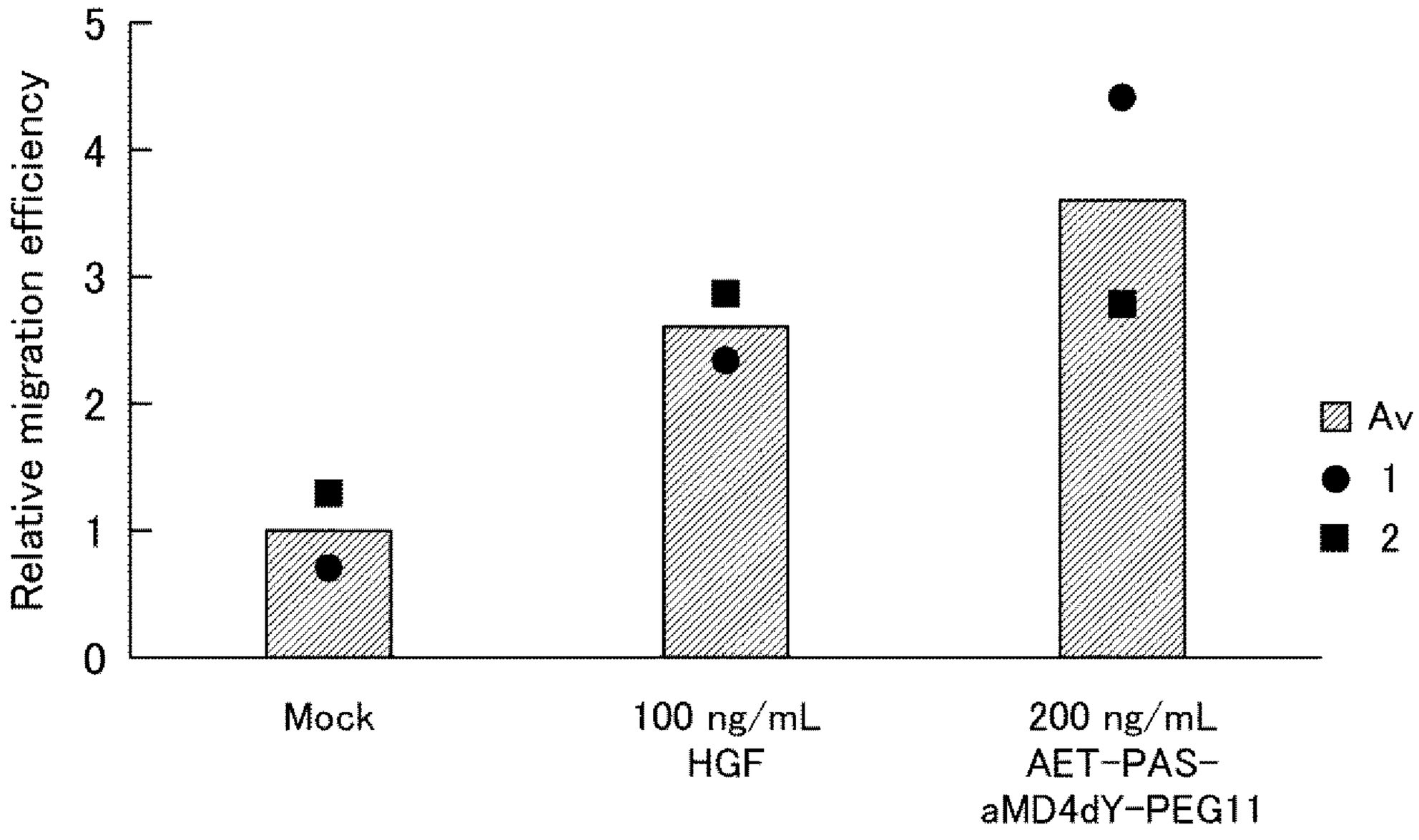
[図13]

FIG.13



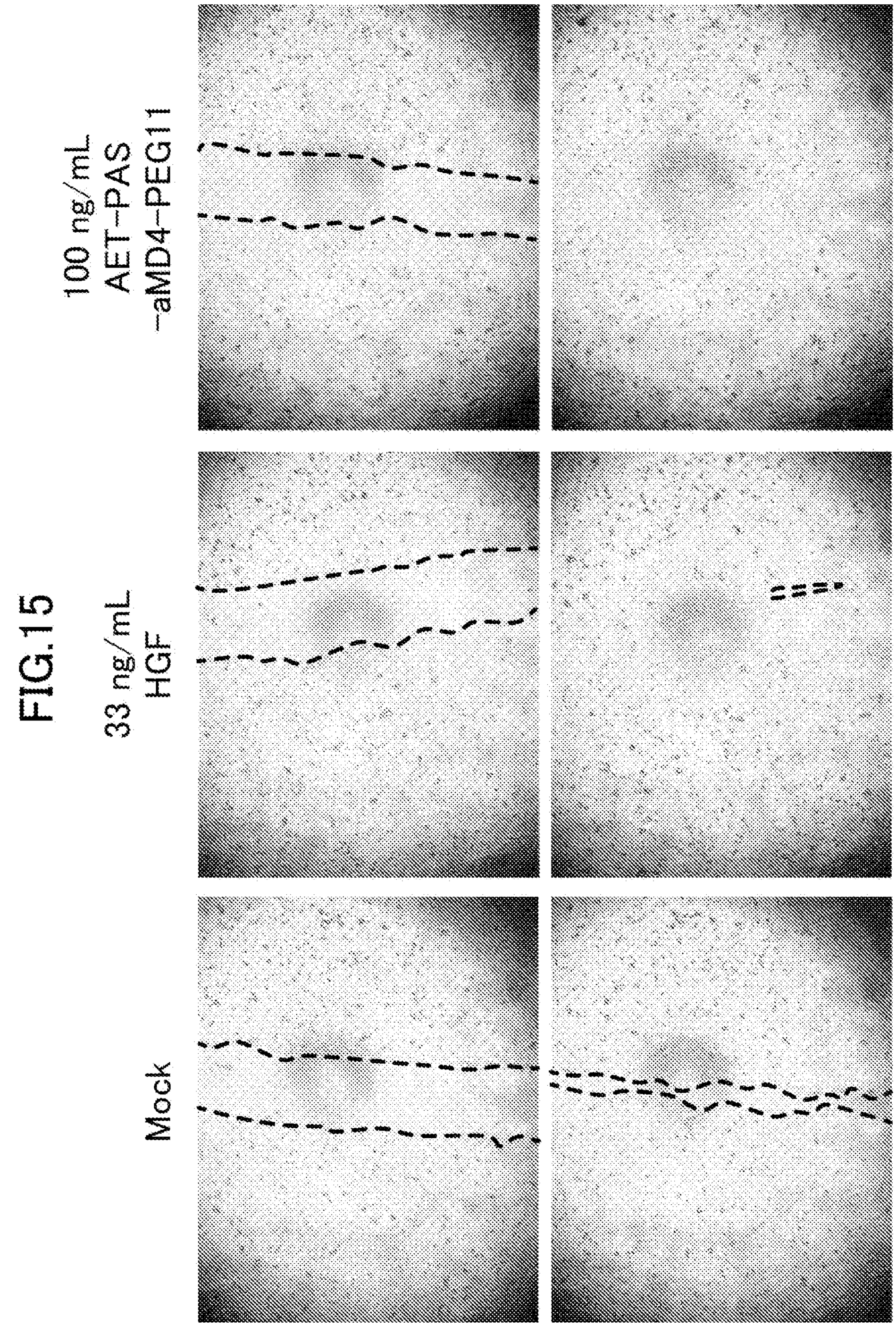
[図14]

FIG.14


Relative migration efficiency
5
4
3
2
1
0
Mock
100 ng/mL HGF
200 ng/mL AET-PAS-aMD4dY-PEG11
Av
1
2

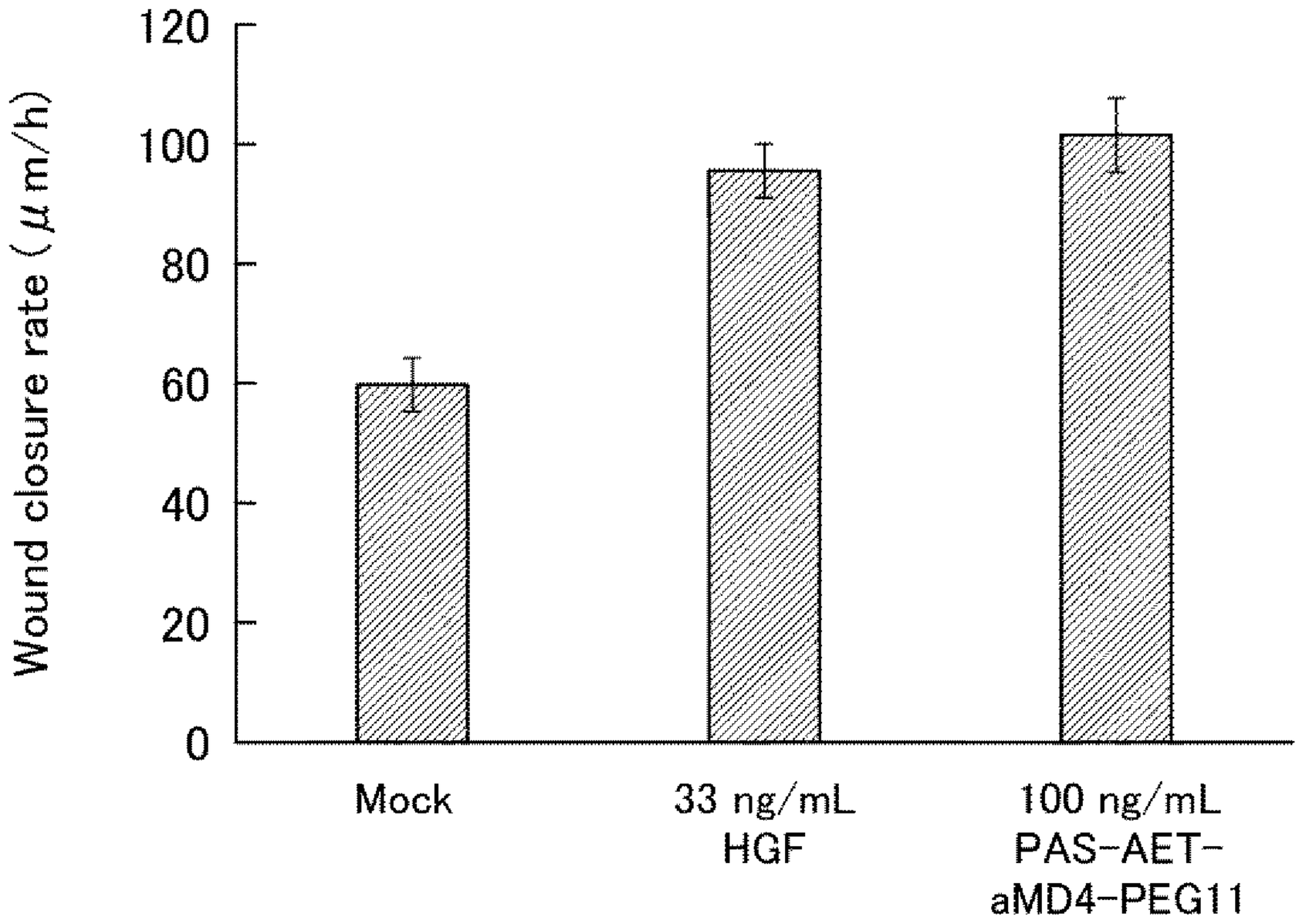
[図15]

FIG.15



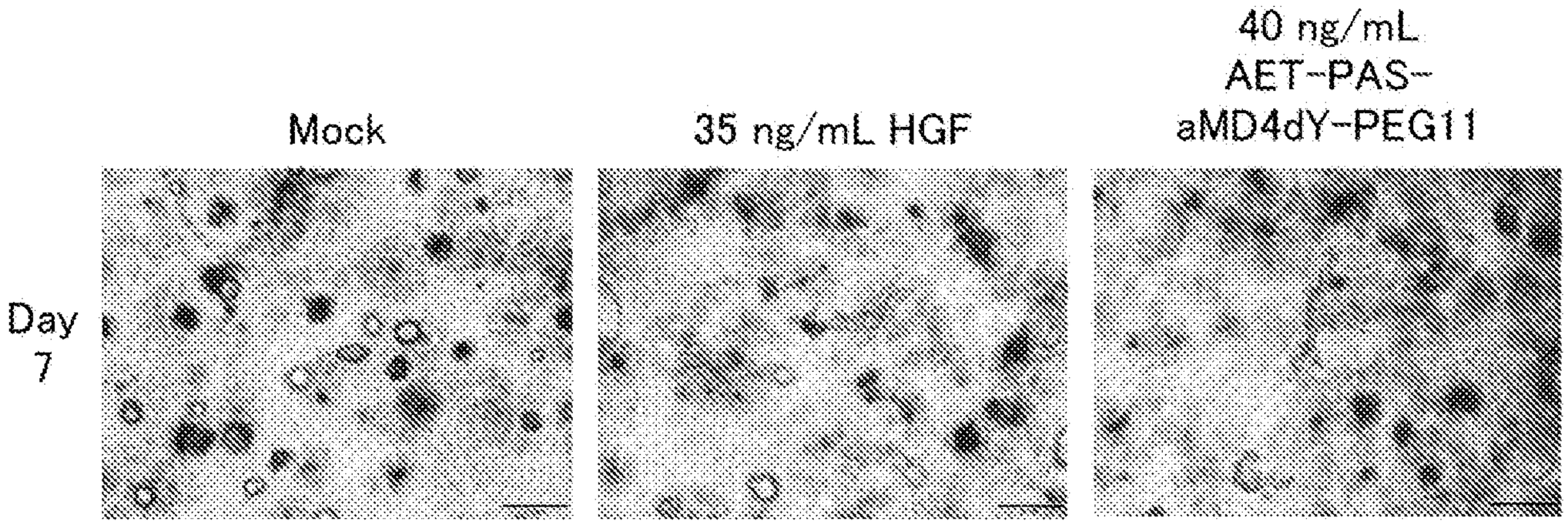
[図16]

FIG.16



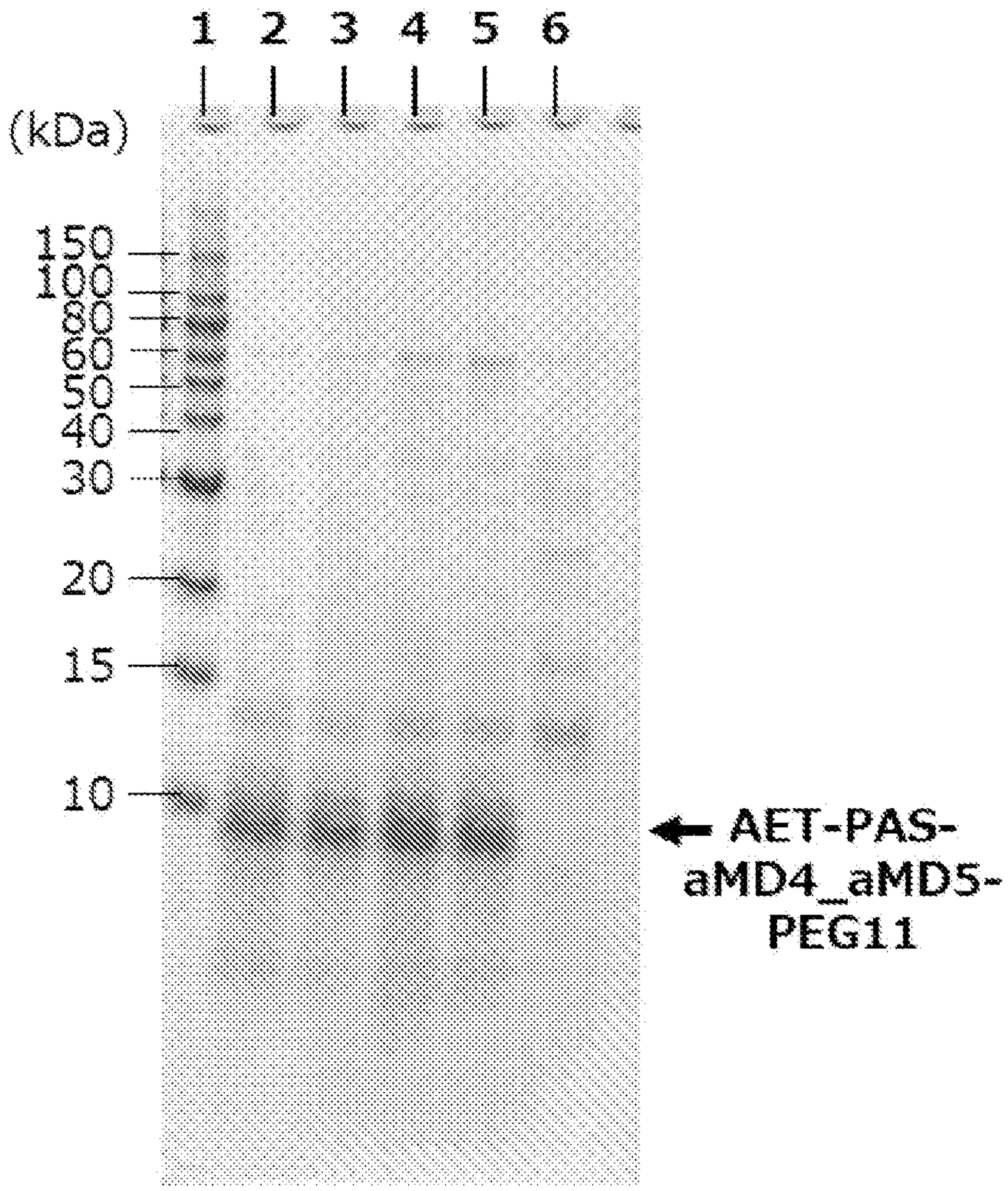
[図17]

FIG.17



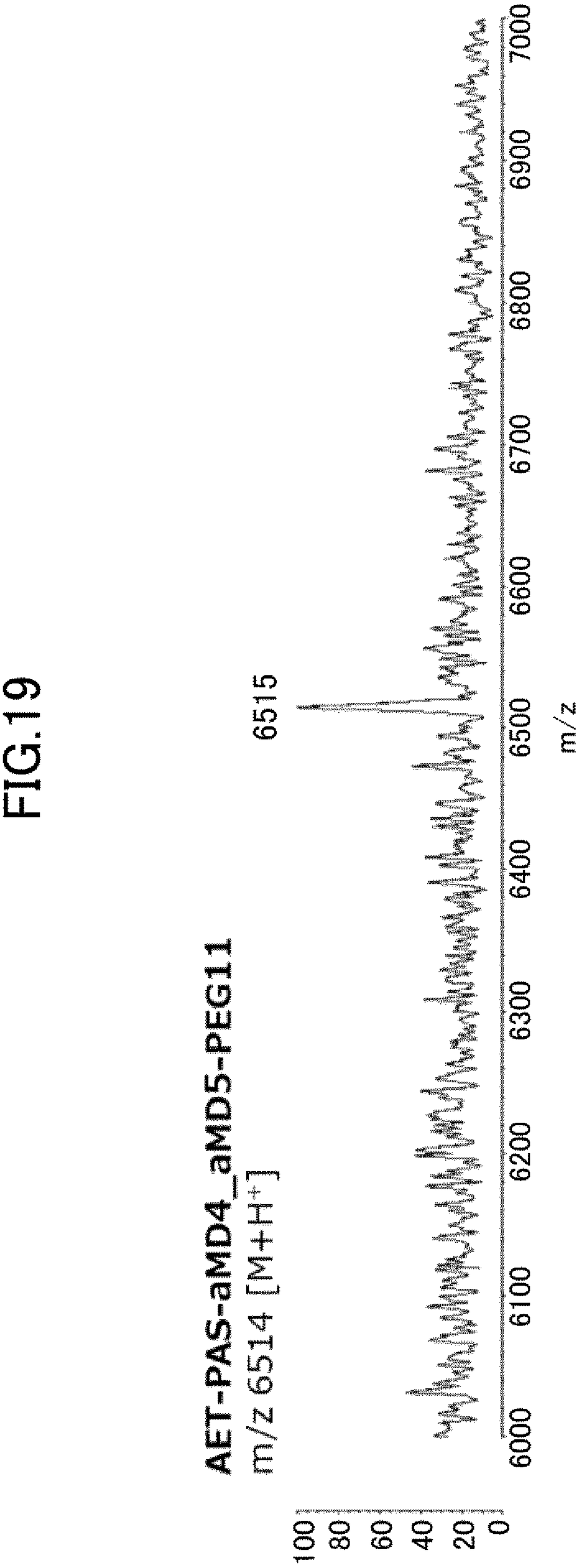
[図18]

FIG.18


1
2
3
4
5
6
(kDa)
150
100
80
60
50
40
30
20
15
10
AET-PAS-aMD4_aMD5-PEG11

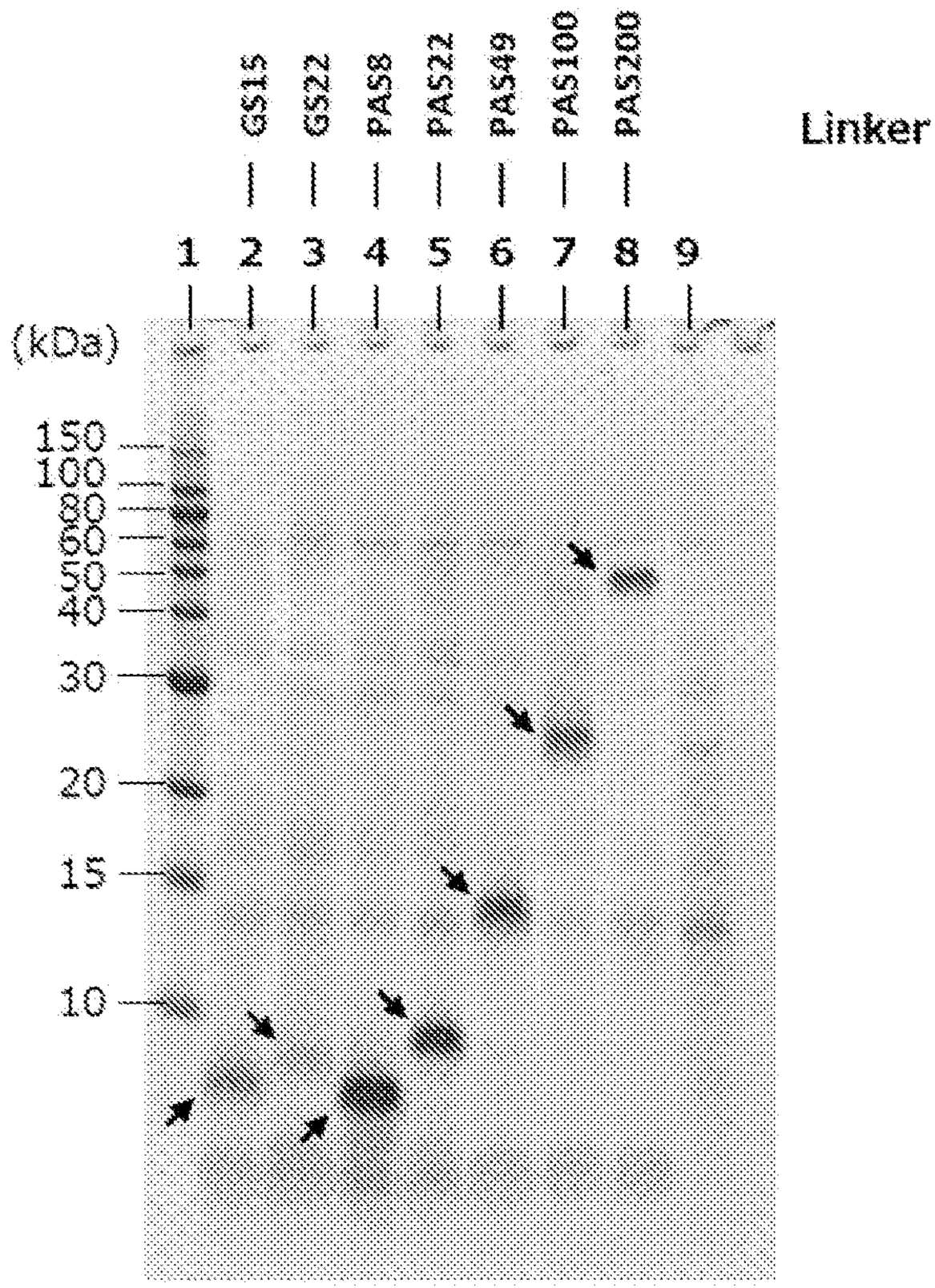
[図19]

FIG.19


AET-PAS-aMD4_aMD5-PEG11
m/z 6514 [M+H+]
100
80
60
40
20
0
6000
6100
6200
6300
6400
6500
6515
6600
6700
6800
6900
7000
m/z

[図20]

FIG.20



1, Marker (XL-Ladder Broad, APRO science)
2, pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-GS15
3, pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-GS22
4, pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS8
5, pPK4_CspBss-AET-PAS-aMD4dY-PEG11
6, pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS49
7, pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS100
8, pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS200
9, pPK4 (empty vector)

[図21]

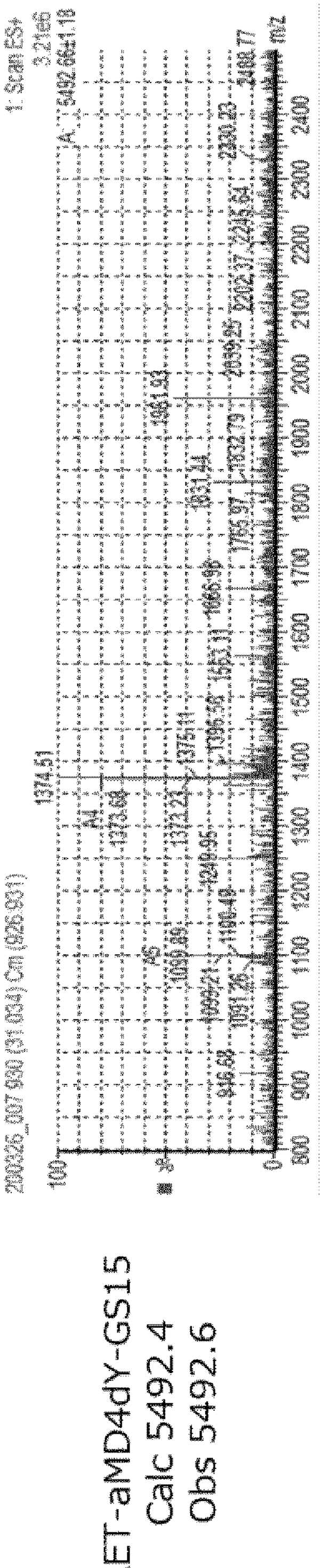
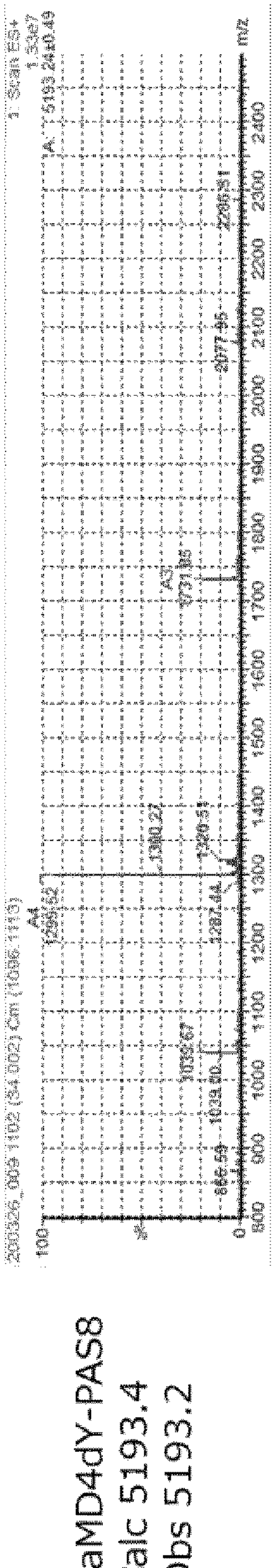


FIG.21

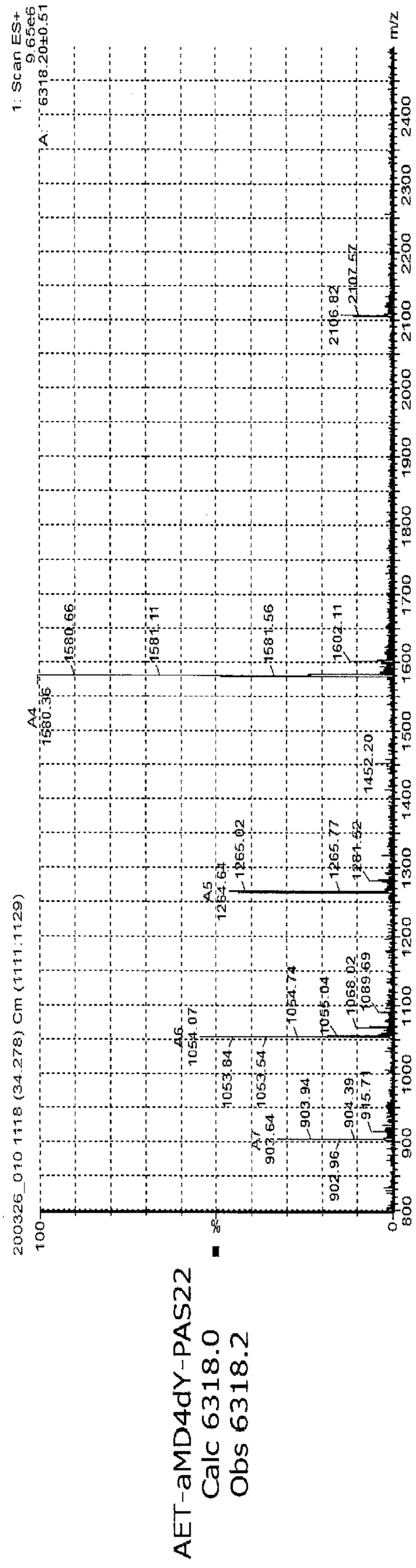
[図22]

FIG.22



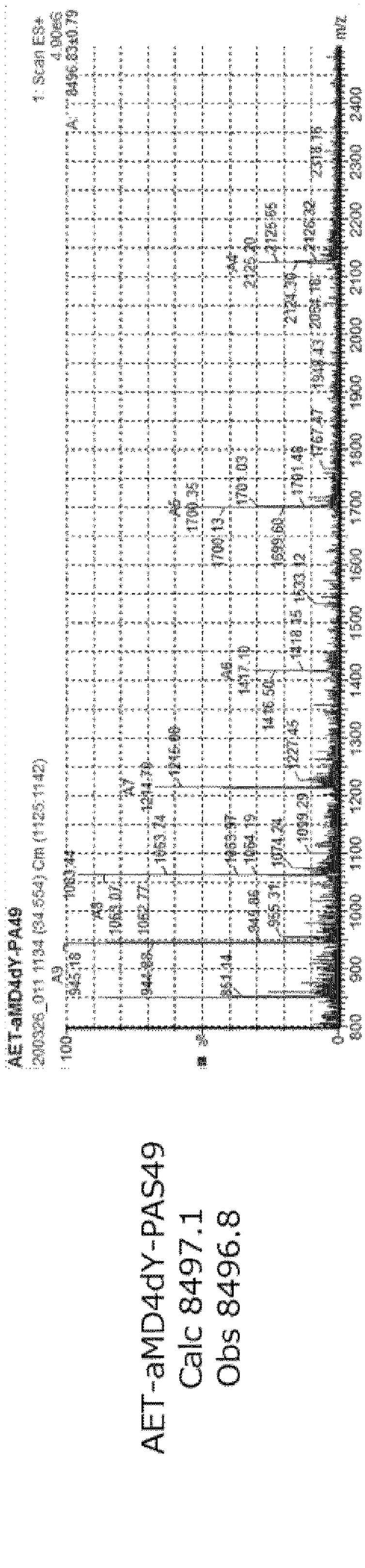
[図 23]

FIG.23


AET-aMD4dY-PAS
Calc 6318.0
Obs 6318.2
1: Scan ES+
9.65e6
6318.20±0.51
A1
A2
A3
A4
1580.36
1580.66
1581.11
1581.56
1602.11
2106.82
2107.57
A5
1264.61
1265.02
1265.77
1281.52
A6
1054.07
1054.74
1055.04
1068.02
1089.69
A7
903.64
903.94
904.39
915.71
902.96
1053.84
1053.54
1452.20
m/z
200326_010 1118 (34.278) Cm (1111:1129)

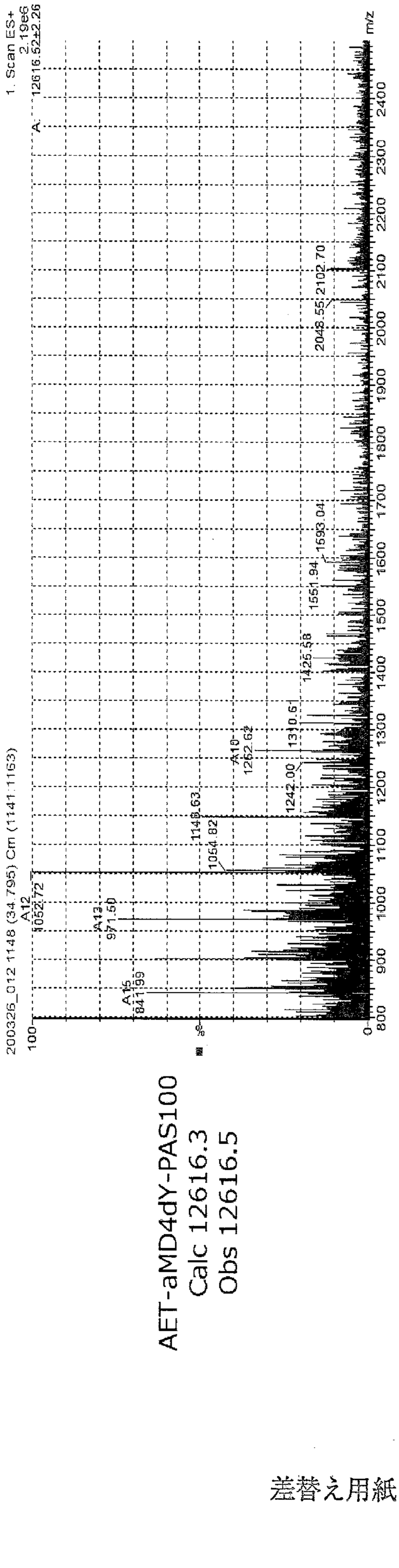
[図24]

FIG.24



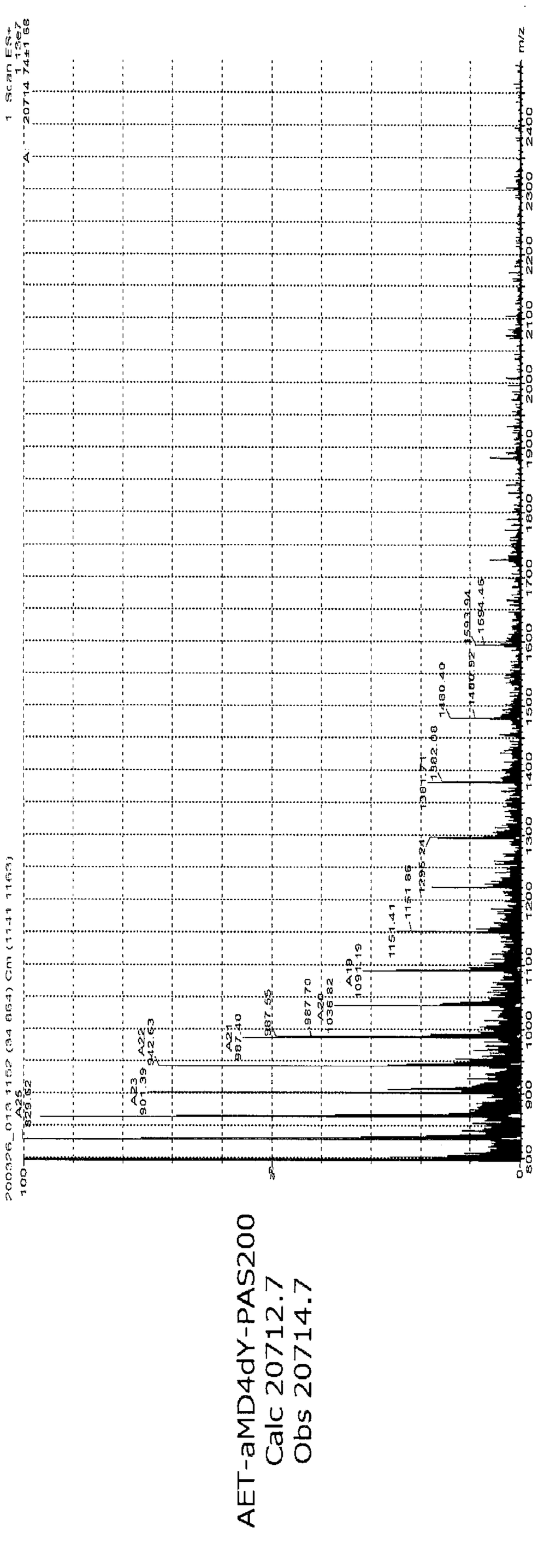
[図 25]

FIG.25


AET-aMD4dY-PAS
Calc 12616.3
Obs 12616.5
1. Scan ES+
2.19e6
12616.52±2.26
A
m/z
2048.55
2102.70
1693.04
1551.94
1425.58
1310.61
1262.62
1242.00
1148.63
1054.82
A12
1052.72
A13
971.50
A15
841.99
100
0
800
900
1000
1100
1200
1300
1400
1500
1600
1700
1800
1900
2000
2100
2200
2300
2400

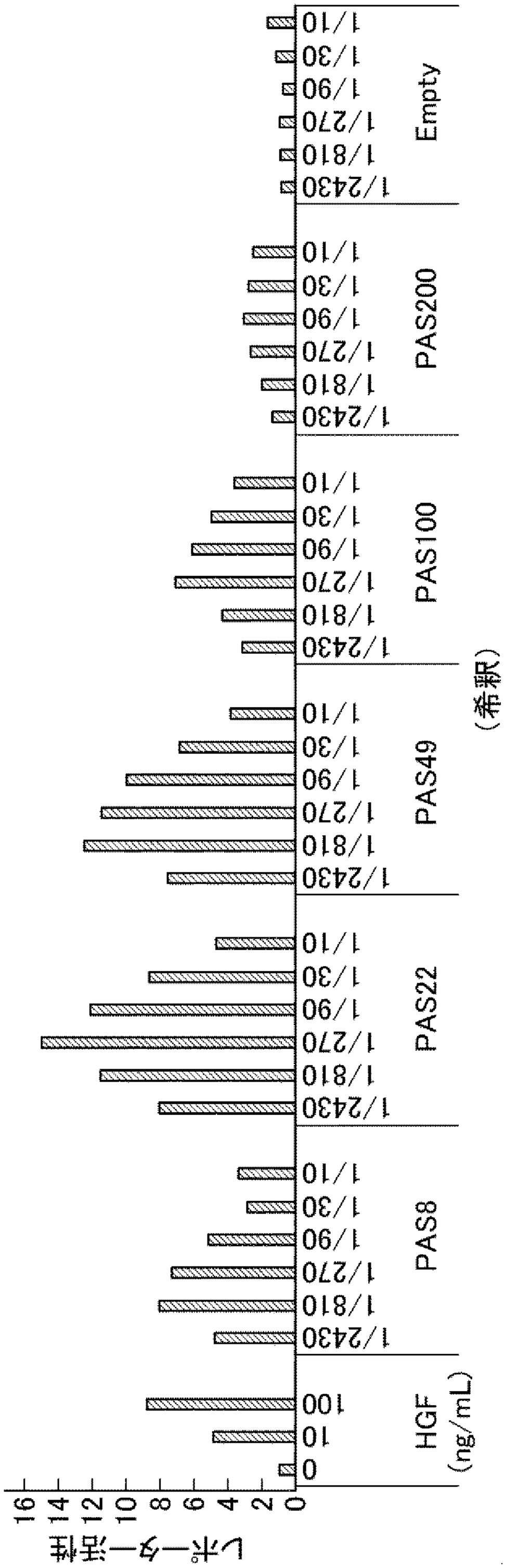
[図 26]

FIG.26


1 Scan ES+
1.13e7
20714.74±1.68
m/z
A
2400
2300
2200
2100
2000
1900
1800
1700
1600
1500
1400
1300
1200
1100
1000
900
800
1594.46
1593.94
1480.92
1480.40
1382.68
1381.71
1296.24
1151.86
1151.41
1091.19
A18
1036.82
A20
987.70
987.55
A21
887.40
842.63
A22
901.39
A23
829.62
A25
100
%
200326_013 1162 (34.864) Cm (1141:1163)
AET-aMD4dY-PAS
Calc 20712.7
Obs 20714.7

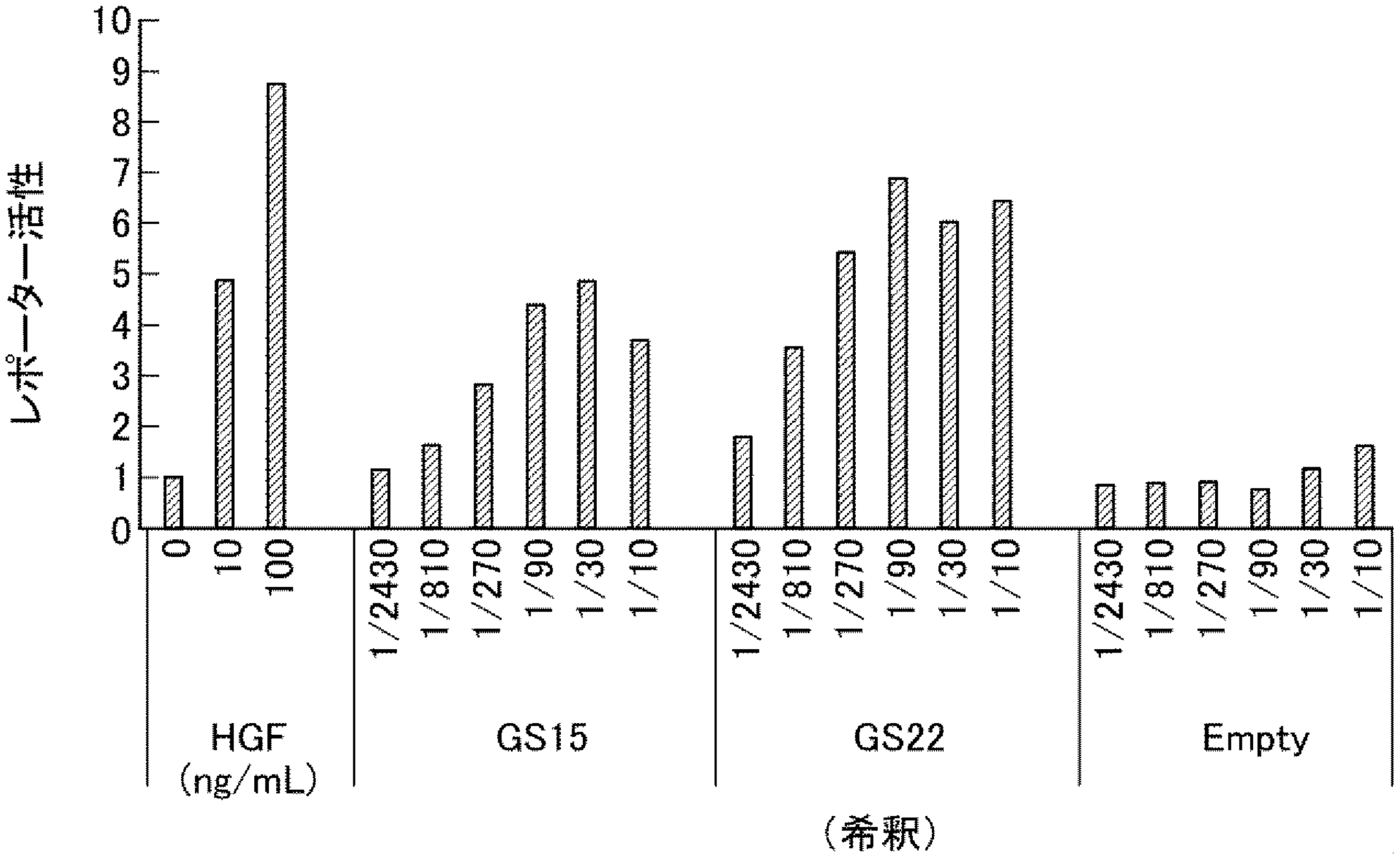
[図27]

FIG.27


Empty
PAS200
PAS100
PAS49
PAS22
PAS8
HGF (ng/mL)
0
10
100
1/10
1/30
1/90
1/270
1/810
1/2430
(希釈)
レポーター活性
0
2
4
6
8
10
12
14
16

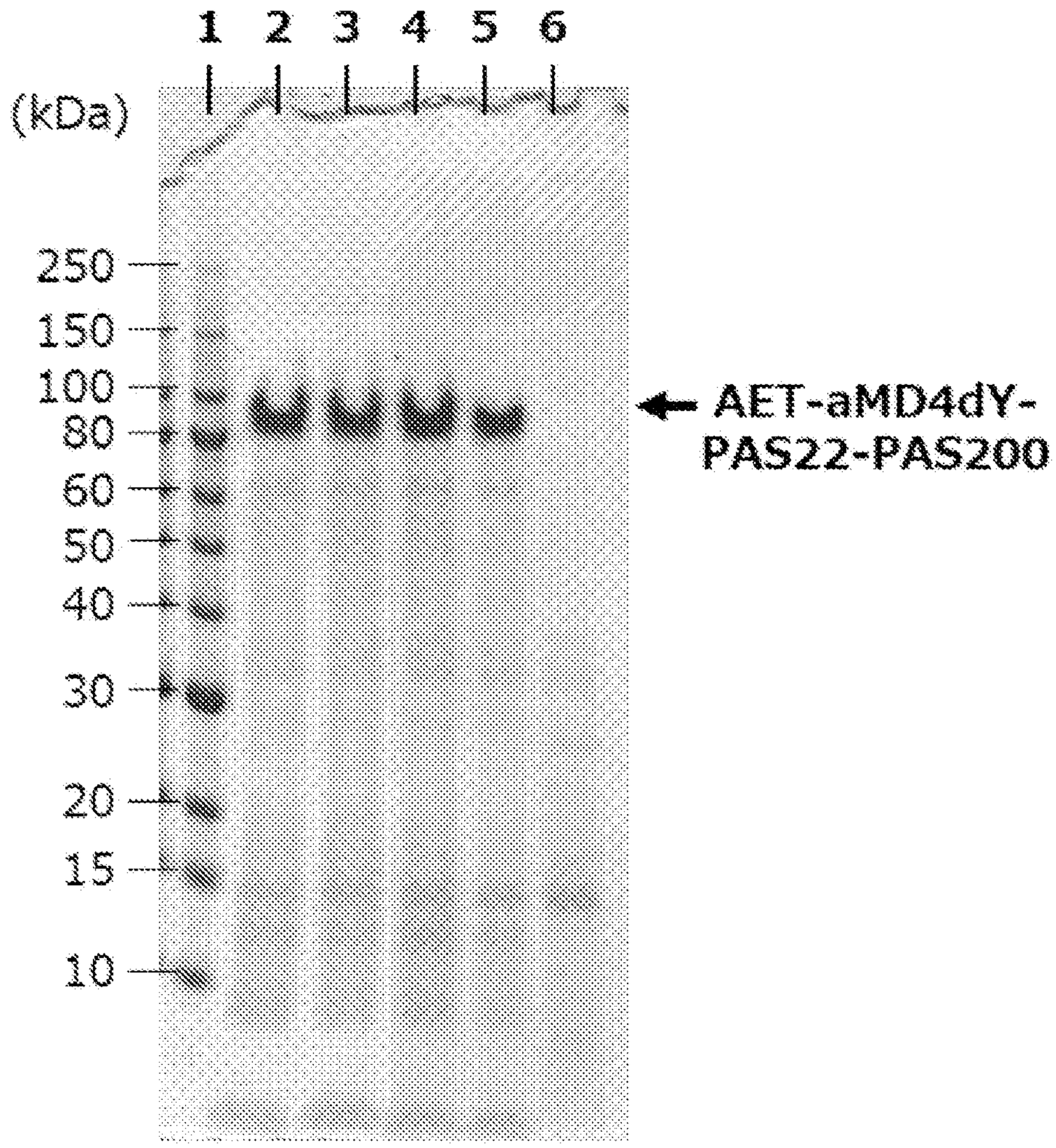
[図28]

FIG.28


レポーター活性
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0
10
100
1/2430
1/810
1/270
1/90
1/30
1/10
1/2430
1/810
1/270
1/90
1/30
1/10
1/2430
1/810
1/270
1/90
1/30
1/10
HGF
(ng/mL)
GS15
GS22
Empty
(希釈)

[図29]

FIG.29



1, Marker (XL-Ladder Broad, APRO science)
2-5, pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS22-PAS200
6, pPK4 (empty vector)

[図 30]

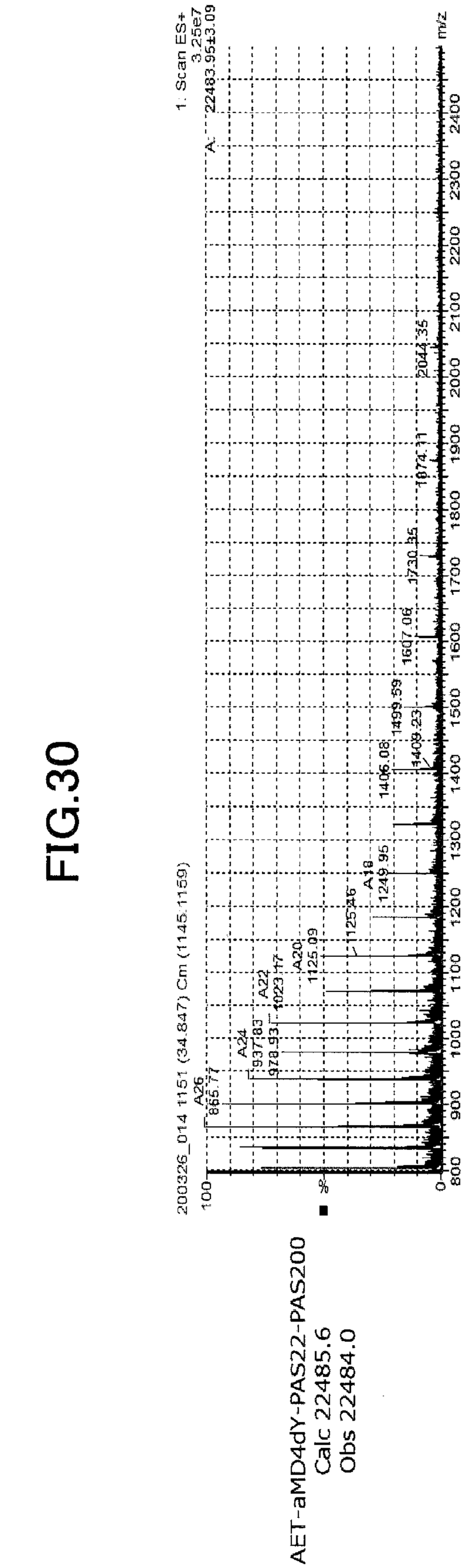
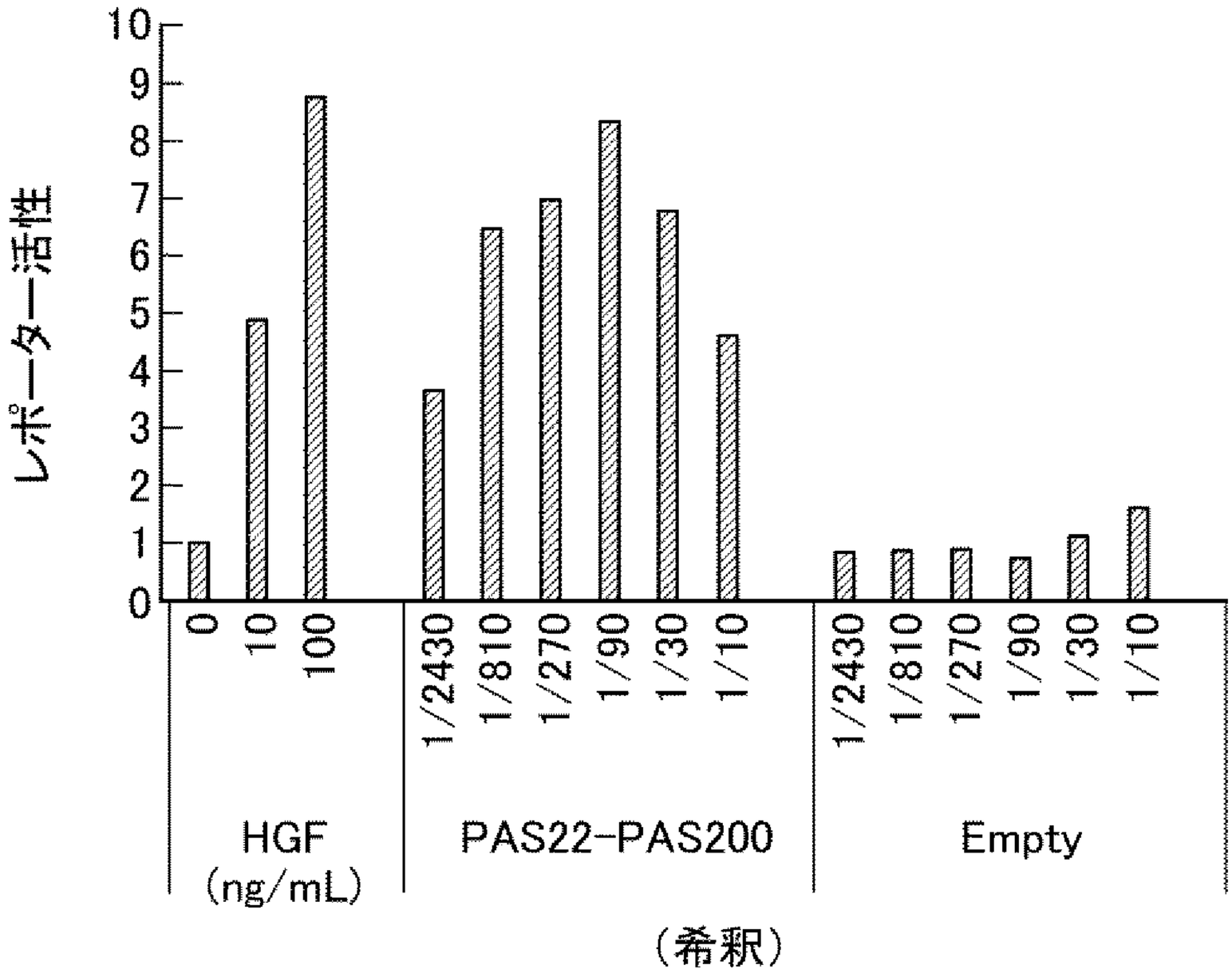

1: Scan ES+
3.25e7
22483.95±3.09
A
m/z
AET-aMD4dY-PAS22-PAS
Calc 22485.6
Obs 22484.0
200326_014 1151 (34.847) Cm (1145:1159)
A26
865.77
A24
937.83
978.93
A22
1023.17
A20
1125.09
1252.26
A18
1249.95
1406.08
1499.59
1607.06
1730.35
1874.11
2044.35

FIG.30

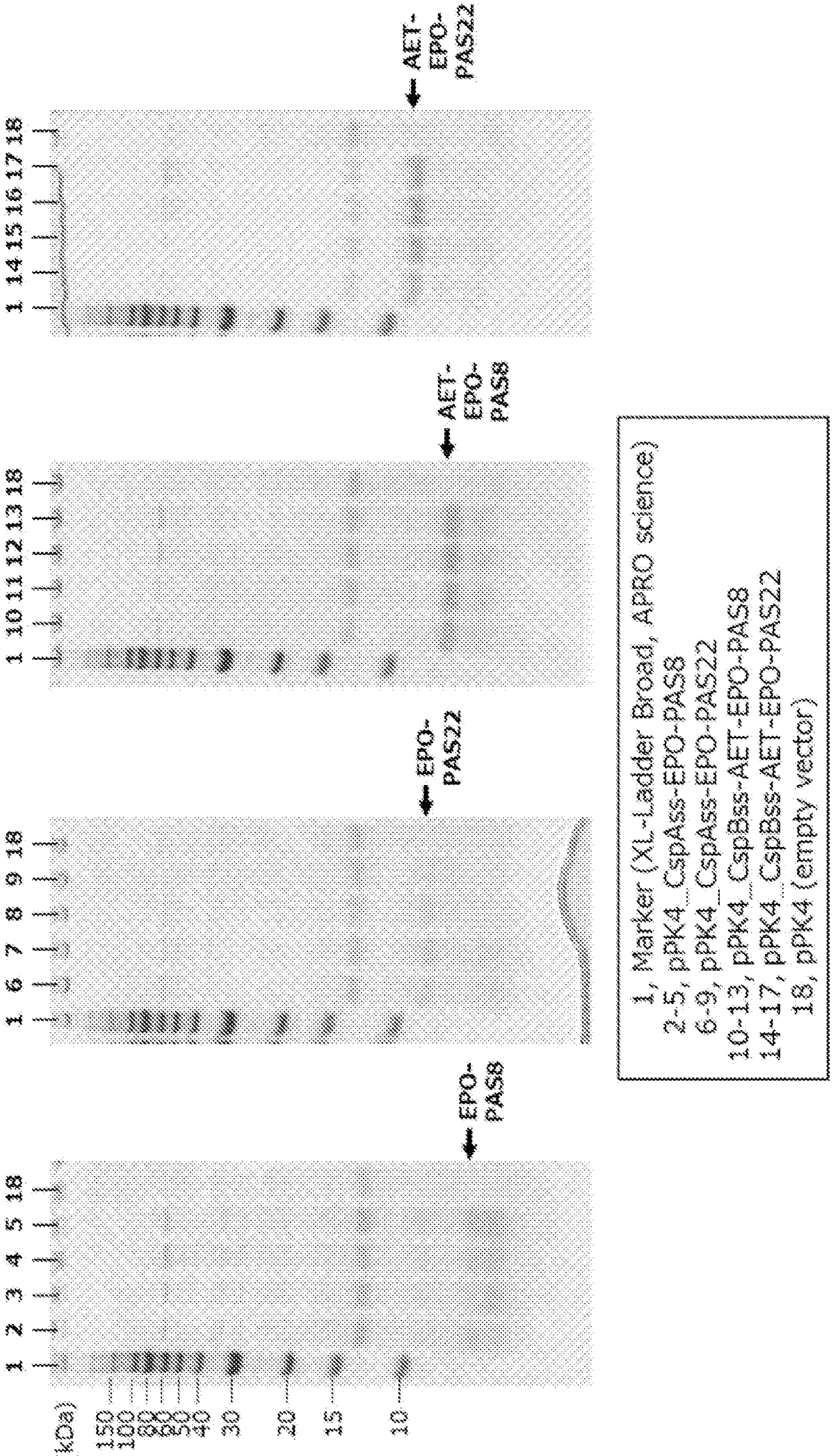
[図31]

FIG.31


レポーター活性
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0
10
100
1/2430
1/810
1/270
1/90
1/30
1/10
1/2430
1/810
1/270
1/90
1/30
1/10
HGF
(ng/mL)
PAS22-PAS200
Empty
（希釈）

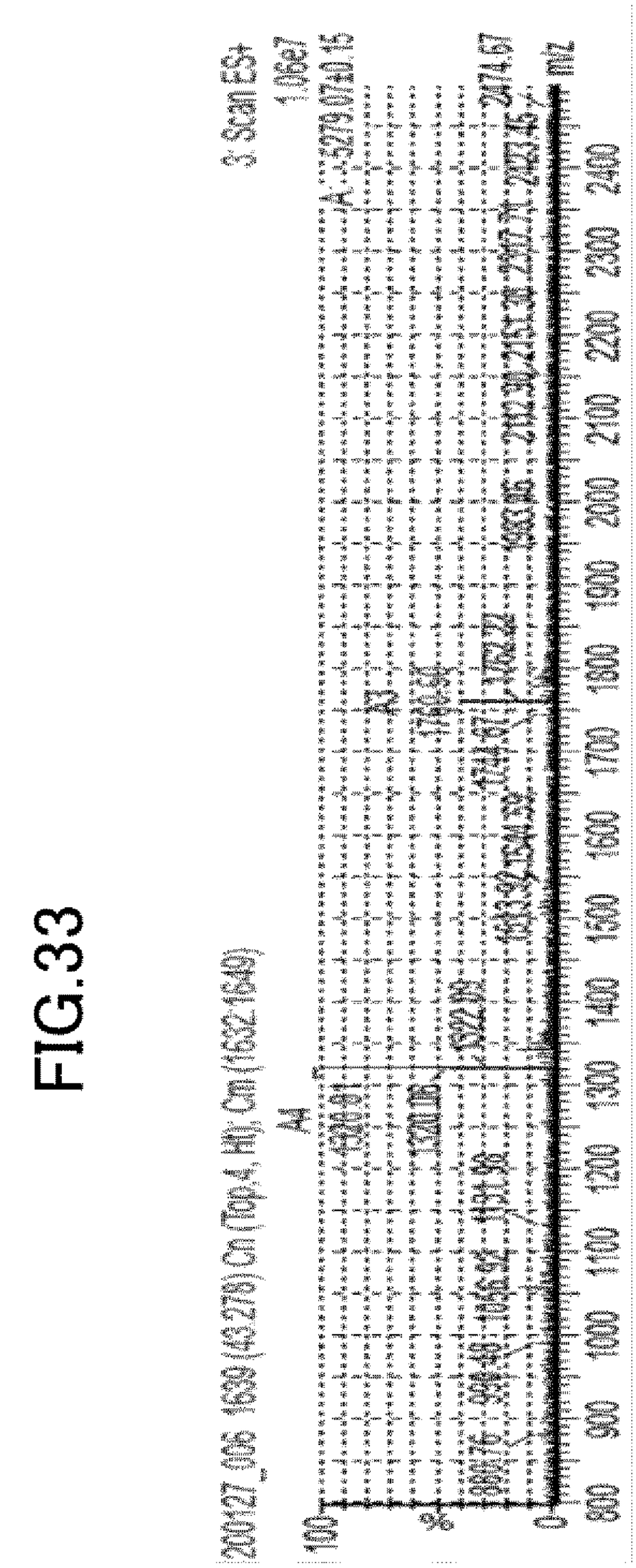
[図32]

FIG.32


AET-EPO-PAS22
1 14 15 16 17 18
AET-EPO-PAS8
1 10 11 12 13 18
EPO-PAS22
1 6 7 8 9 18
EPO-PAS8
1 2 3 4 5 18
(kDa)
130
70
55
40
35
25
15
10
1, Marker (XL-Ladder Broad, APRO science)
2-5, pPK4_CspAss-EPO-PAS8
6-9, pPK4_CspAss-EPO-PAS22
10-13, pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS8
14-17, pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS22
18, pPK4 (empty vector)

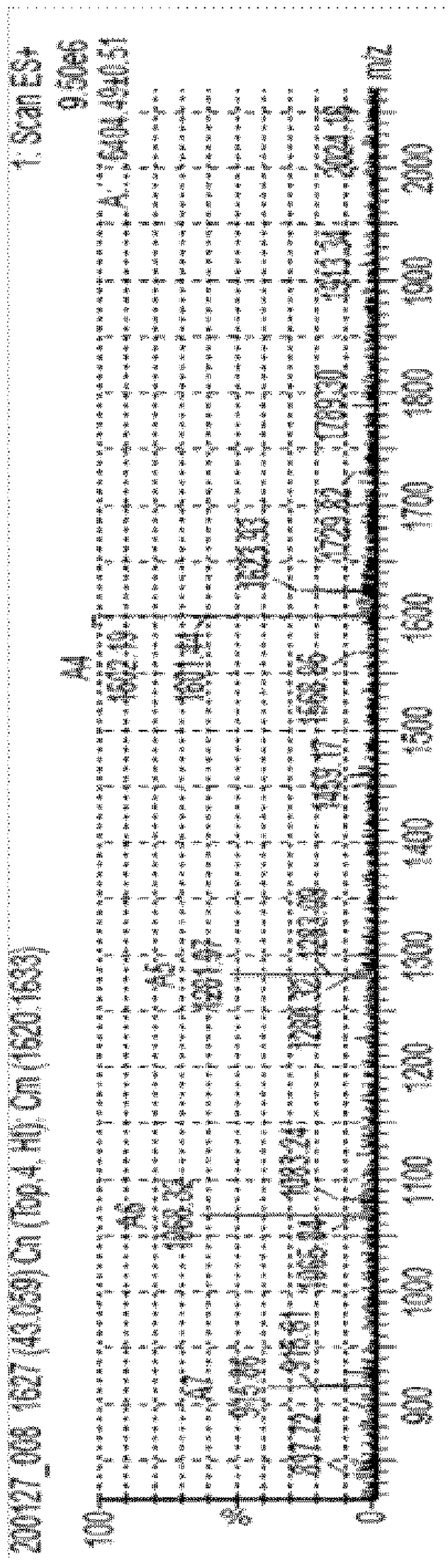
[図33]

FIG.33



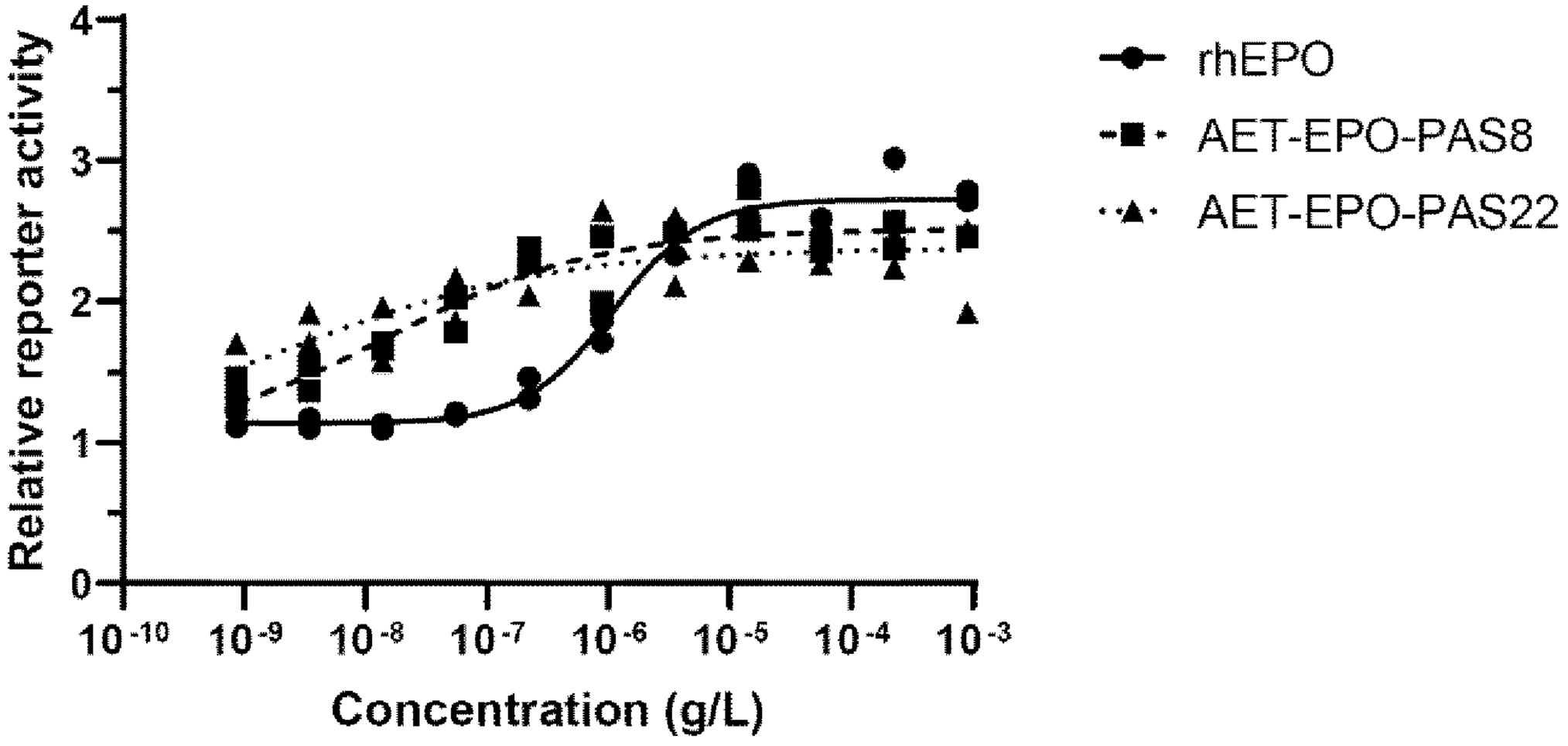
[図34]

FIG.34



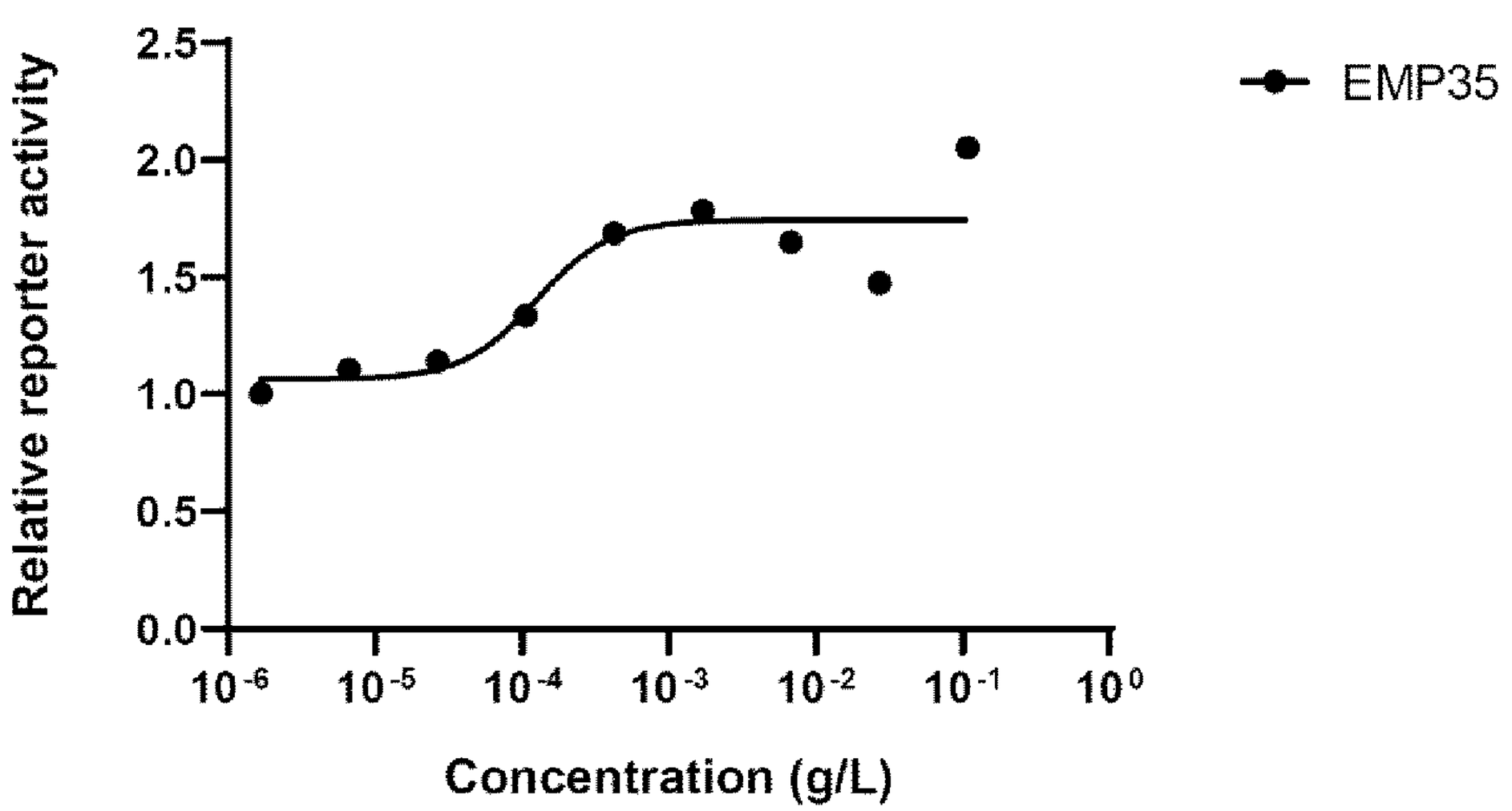
[図35]

FIG.35



[図36]

FIG.36



[図37]

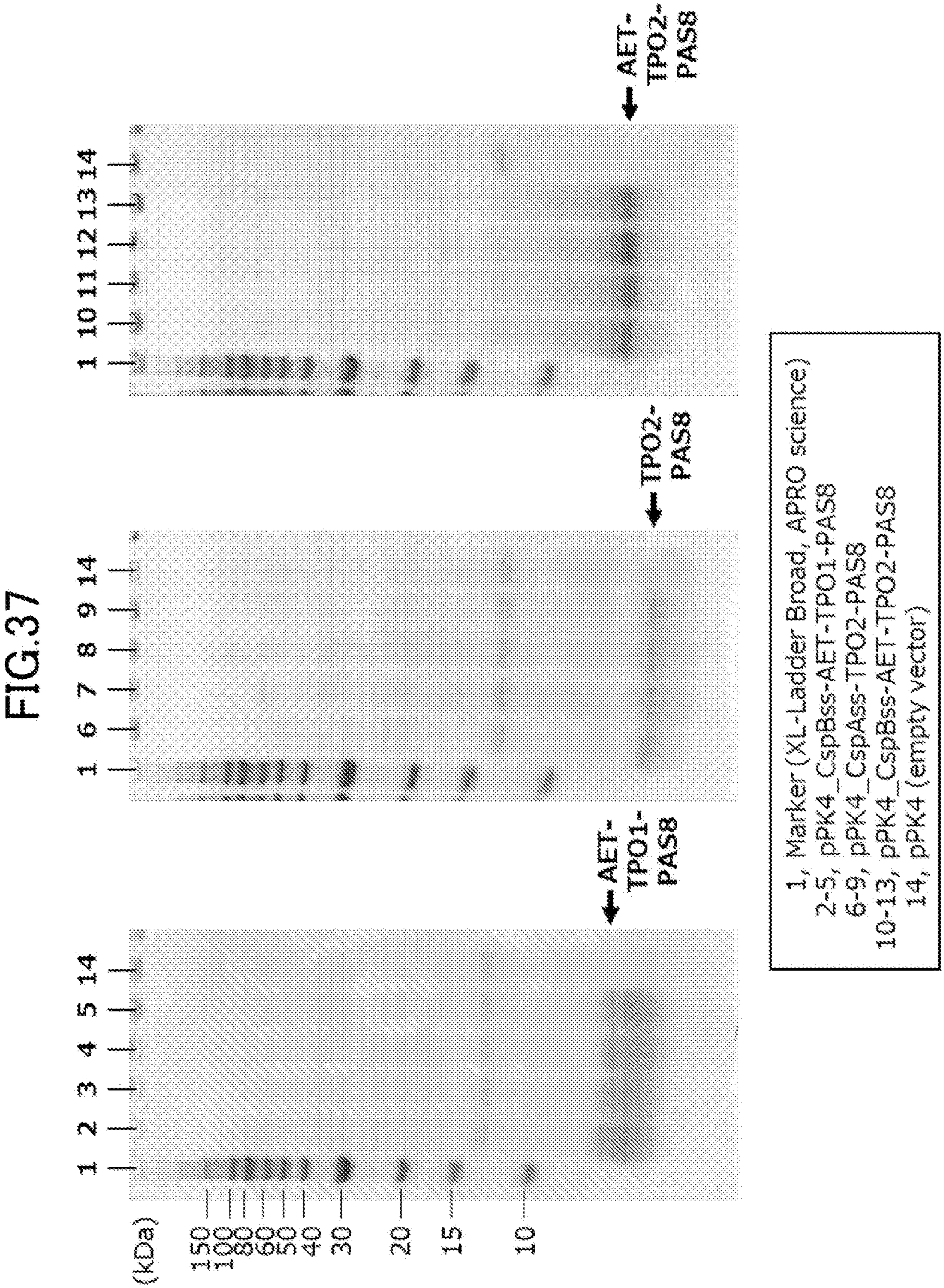
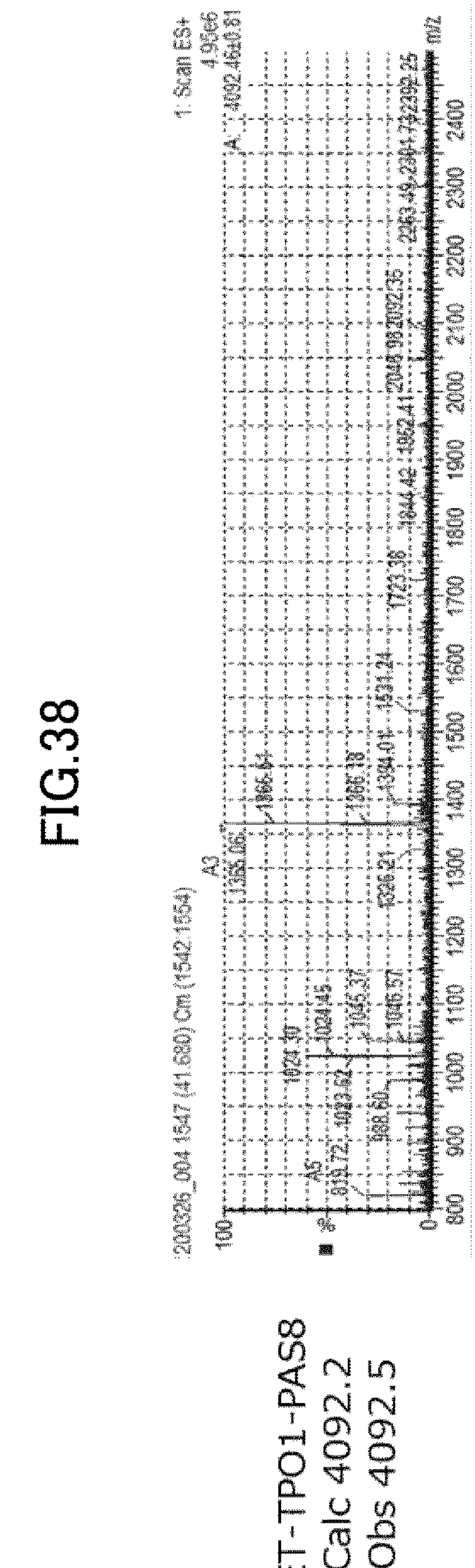

AET-TPO2-PAS8
1 10 11 12 13 14
TPO2-PAS8
1 6 7 8 9 14
AET-TPO1-PAS8
1 2 3 4 5 14
(kDa)
66
45
30
20
15
10
1, Marker (XL-Ladder Broad, APRO science)
2-5, pPK4_CspBss-AET-TPO1-PAS8
6-9, pPK4_CspAss-TPO2-PAS8
10-13, pPK4_CspBss-AET-TPO2-PAS8
14, pPK4 (empty vector)

FIG.37

[図38]

FIG.38



[図39]

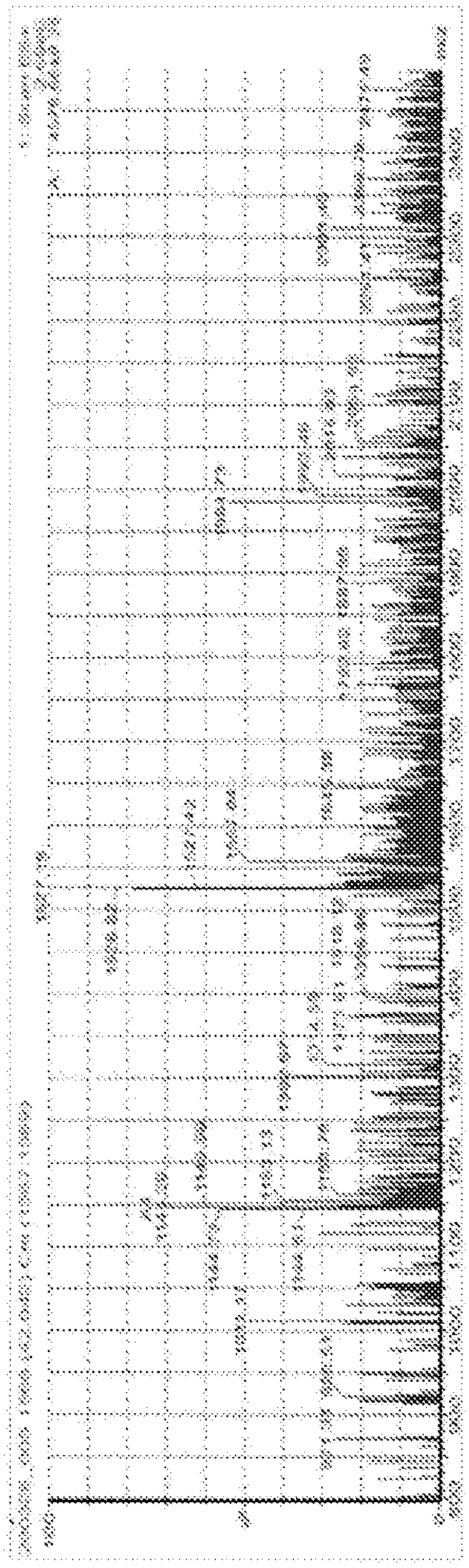


FIG.39

[図40]

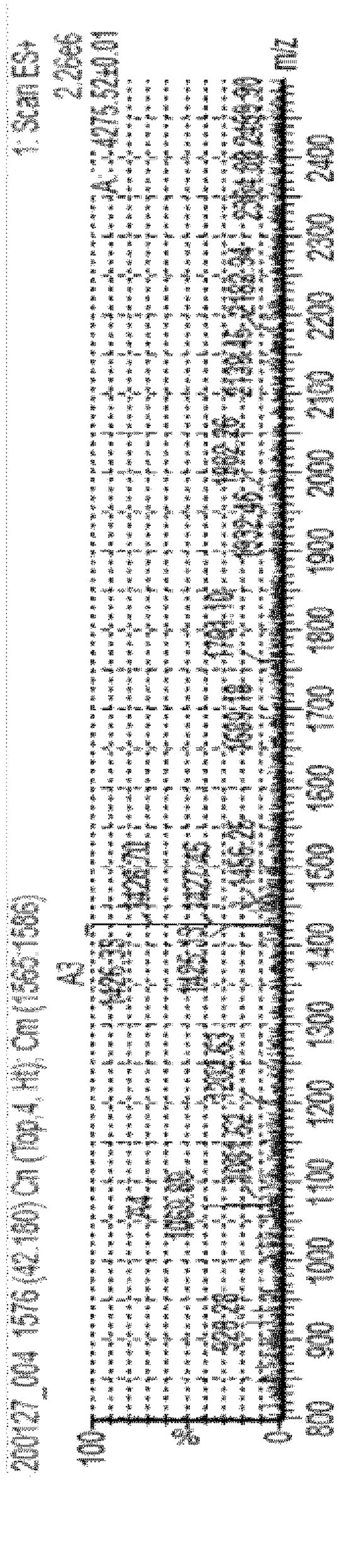
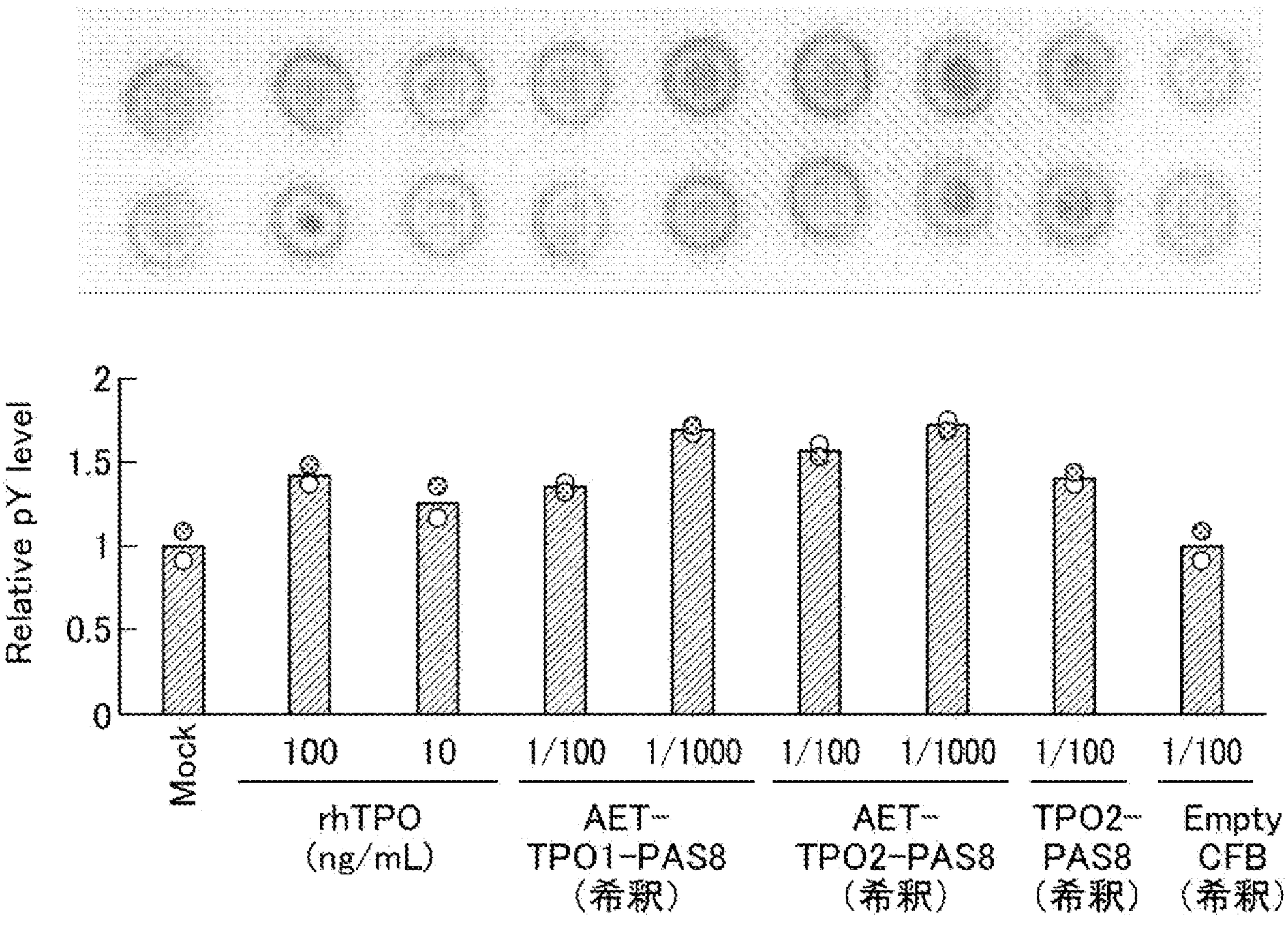


FIG.40

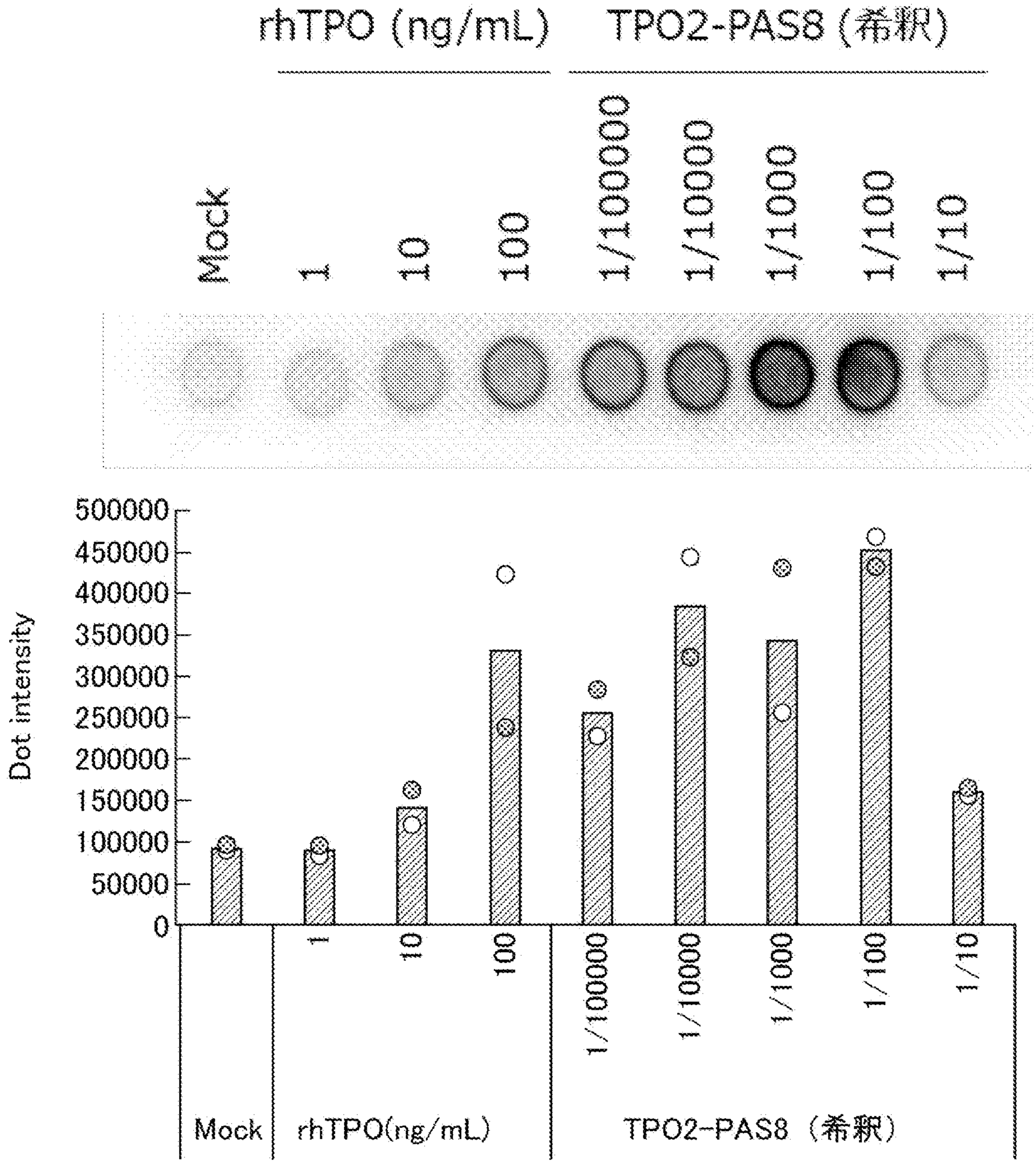
[図41]

FIG.41


rhTPO (ng/mL)
AET-TPO1-PAS8 (希釈)
AET-TPO2-PAS8 (希釈)
TPO2-PAS8 (希釈)
Empty CFB (希釈)
100
10
1/100
1/1000
1/100
1/1000
1/100
1/100
Relative pY level
2
1.5
1
0.5
0
Mock

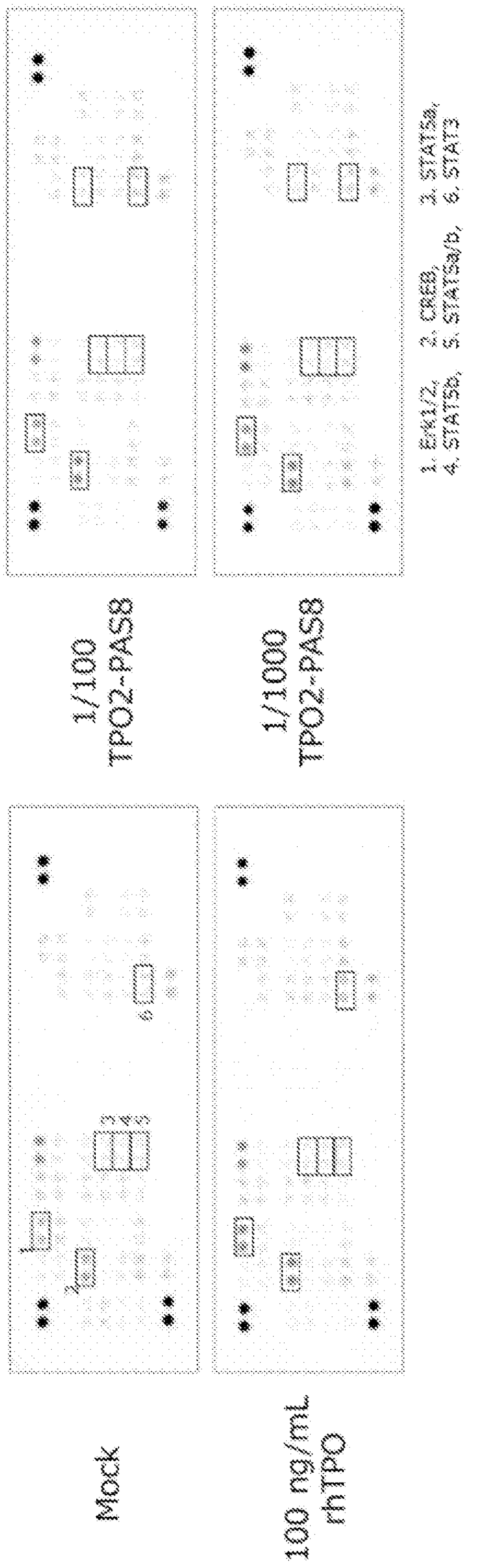
[図42]

FIG.42


rhTPO (ng/mL)
TPO2-PAS8 (希釈)
Mock
1
10
100
1/100000
1/10000
1/1000
1/100
1/10
Dot intensity
500000
450000
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
Mock
rhTPO(ng/mL)
TPO2-PAS8 （希釈）

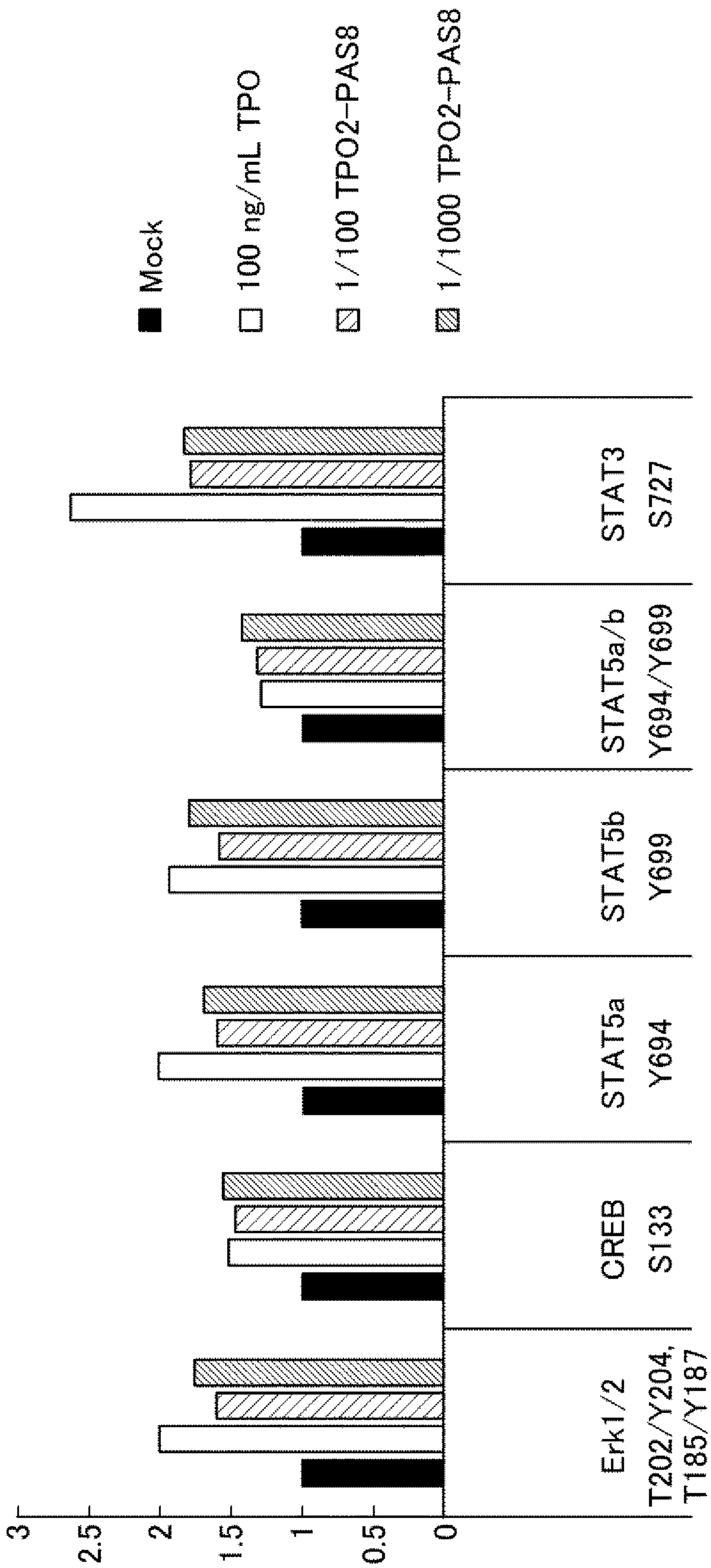
[図43]

FIG. 43


1/100
TPO2-PAS8
1/1000
TPO2-PAS8
Mock
100 ng/mL
rhTPO
1, Erk1/2, 2,
4, STAT5a, 5,
CD69, 3, STAT5a/b,
3, STAT5a,
6, STAT3

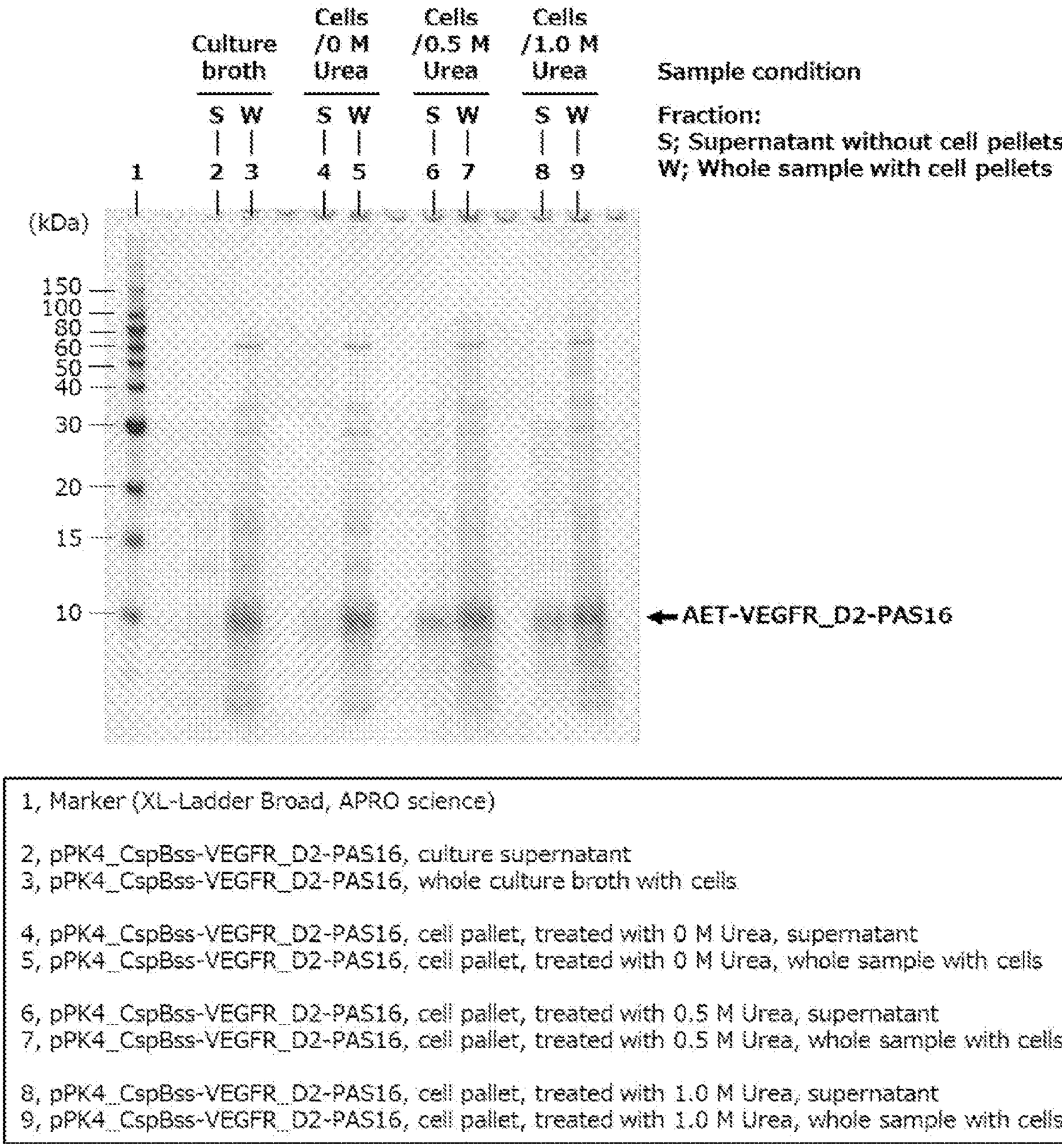
[図44]

FIG.44


Mock
100 ng/mL TPO
1/100 TPO2-PAS8
1/1000 TPO2-PAS8
STAT3 S727
STAT5a/b Y694/Y699
STAT5b Y699
STAT5a Y694
CREB S133
Erk1/2 T202/Y204, T185/Y187
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Relative dot intensity

[図45]

FIG.45



1, Marker (XL-Ladder Broad, APRO science)

2, pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS16, culture supernatant
3, pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS16, whole culture broth with cells

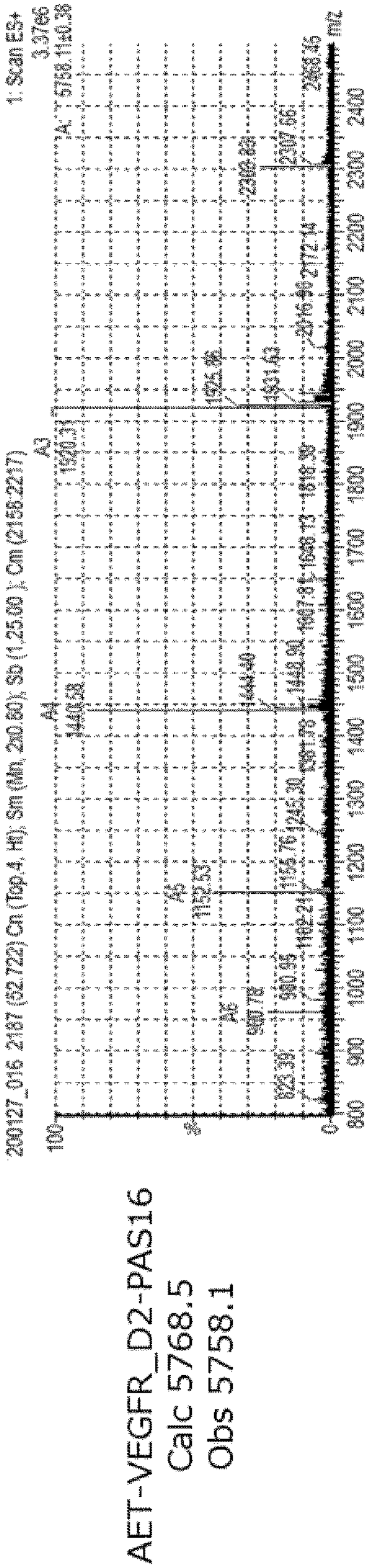
4, pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS16, cell pallet, treated with 0 M Urea, supernatant
5, pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS16, cell pallet, treated with 0 M Urea, whole sample with cells

6, pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS16, cell pallet, treated with 0.5 M Urea, supernatant
7, pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS16, cell pallet, treated with 0.5 M Urea, whole sample with cells

8, pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS16, cell pallet, treated with 1.0 M Urea, supernatant
9, pPK4_CspBss-VEGFR_D2-PAS16, cell pallet, treated with 1.0 M Urea, whole sample with cells

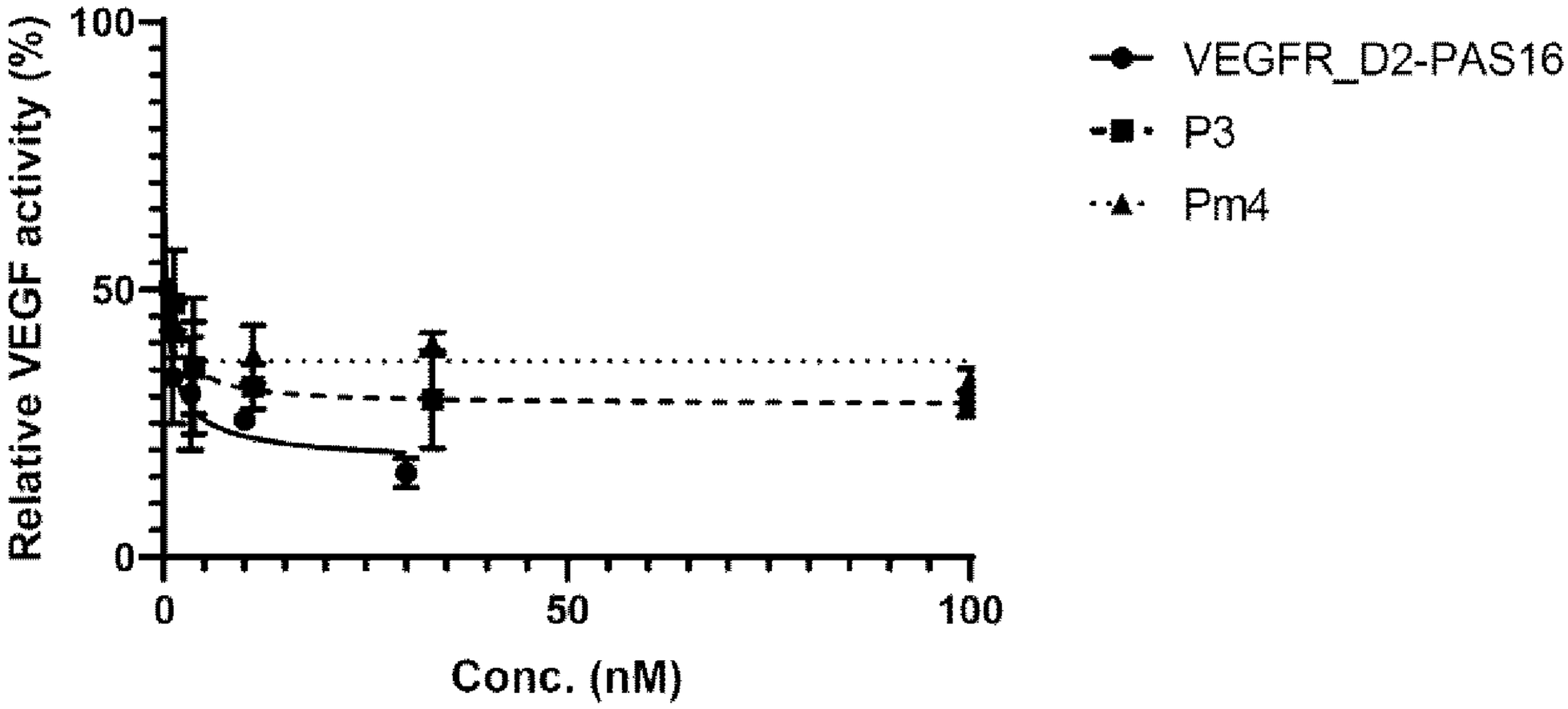
[図46]

FIG.46



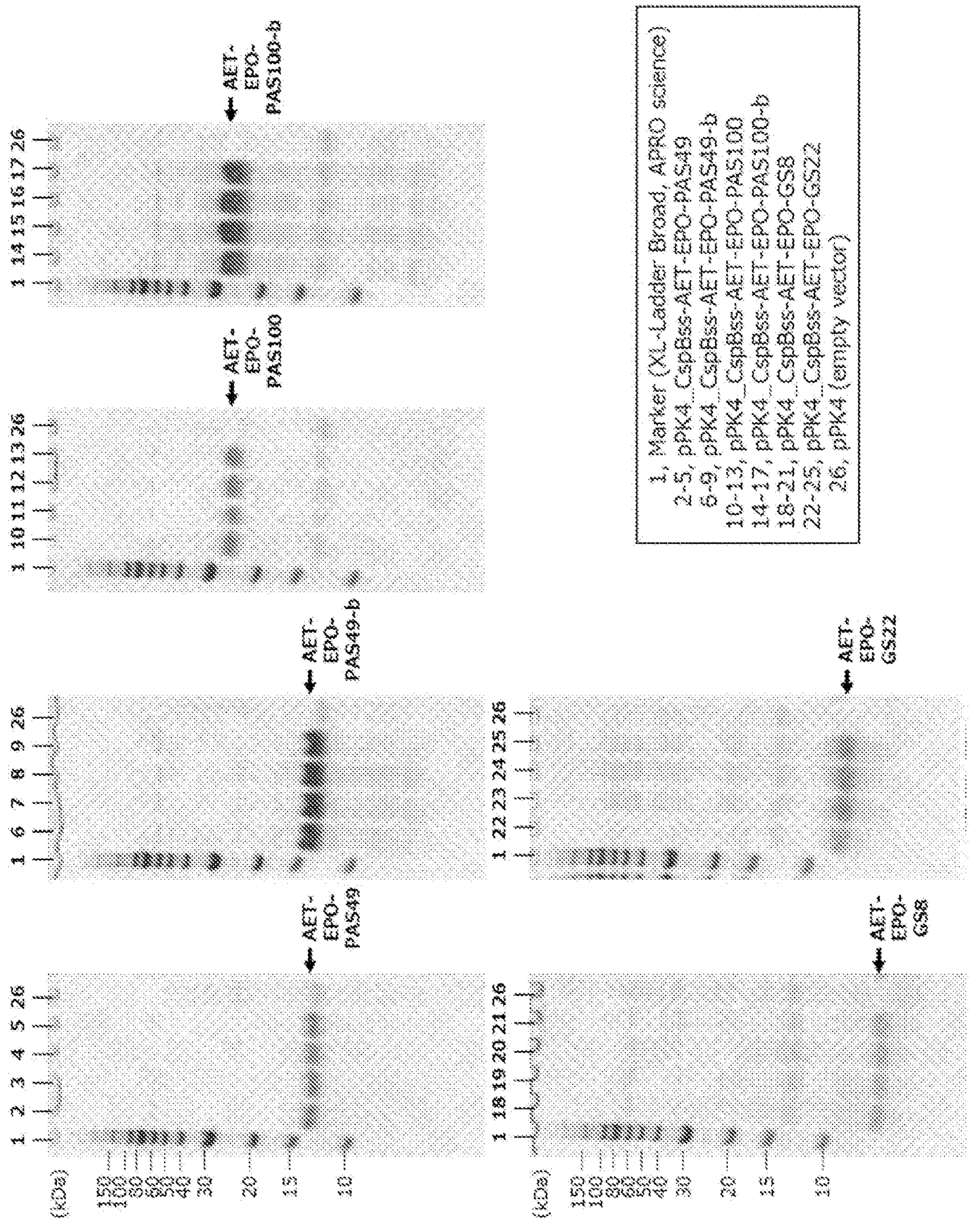
[図47]

FIG.47


Relative VEGF activity (%)
100
50
0
0
50
100
Conc. (nM)
VEGFR_D2-PAS16
P3
Pm4

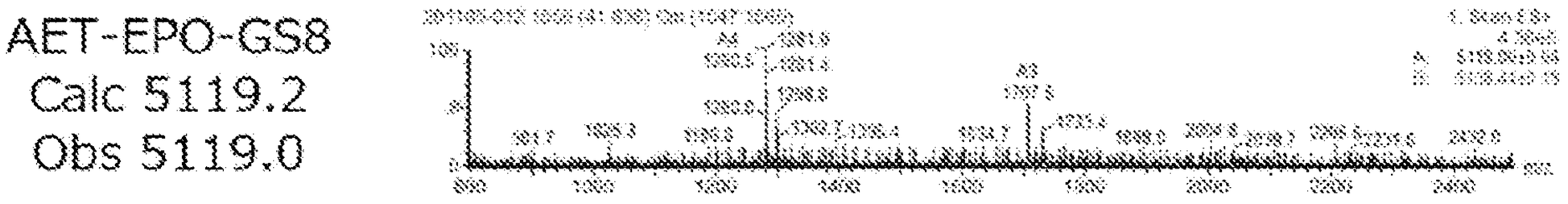
[図48]

FIG.48



[図49]

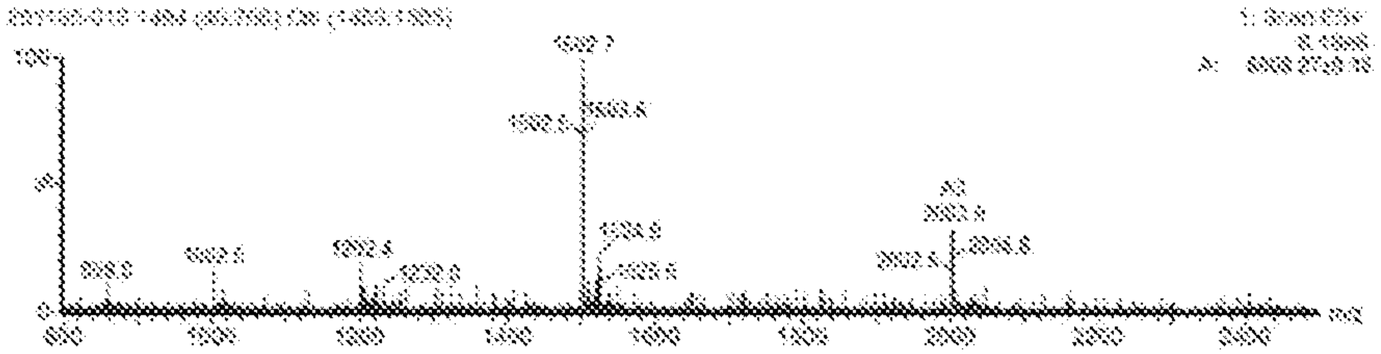
FIG.49



[図50]

FIG.50

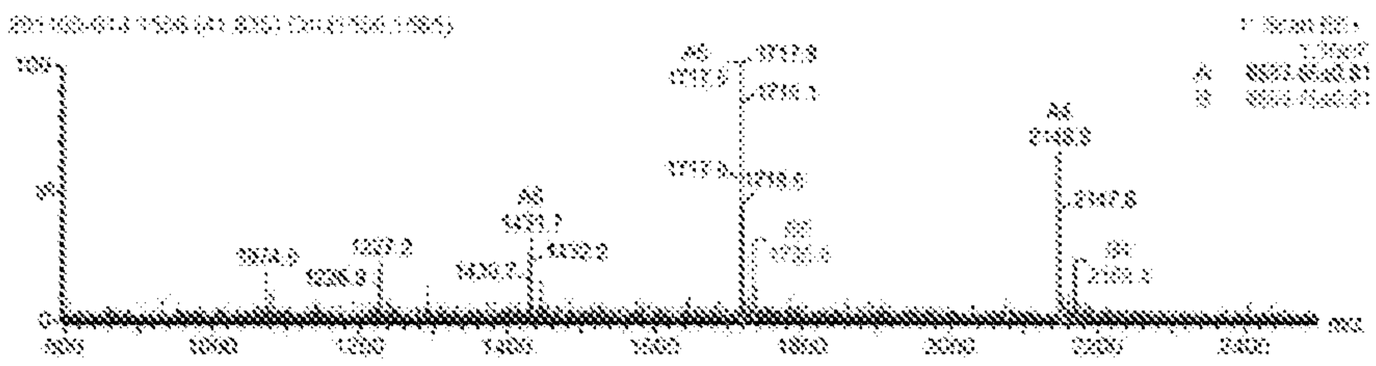
AET-EPO-GS22
Calc 6007.6
Obs 6008.3



[図51]

FIG.51

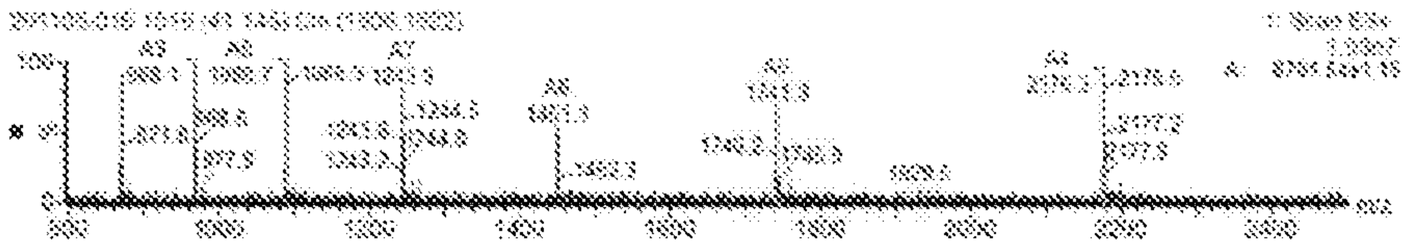
AET-EPO-PAS49
Calc 8584.2
Obs 8584.1



[図52]

FIG.52

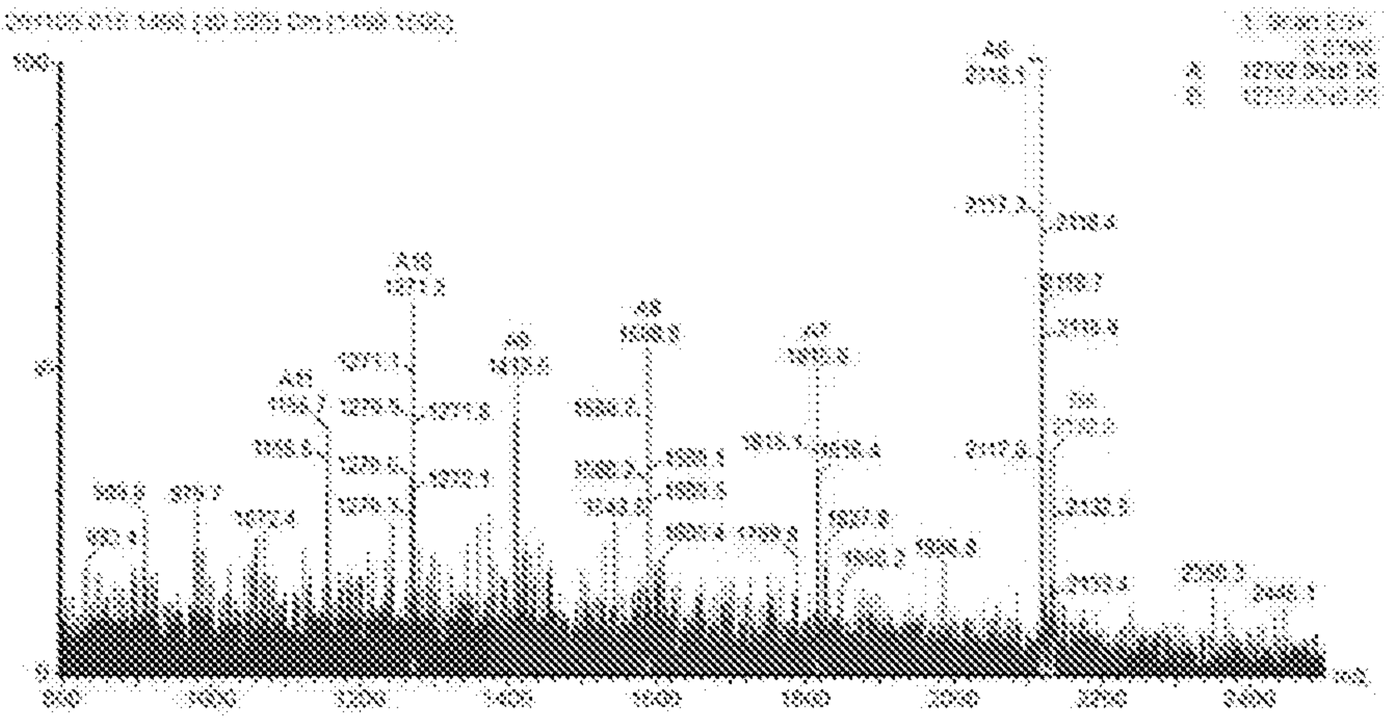
AET-EPO-PAS49-b
Calc 8700.9
Obs 8701.2



[図53]

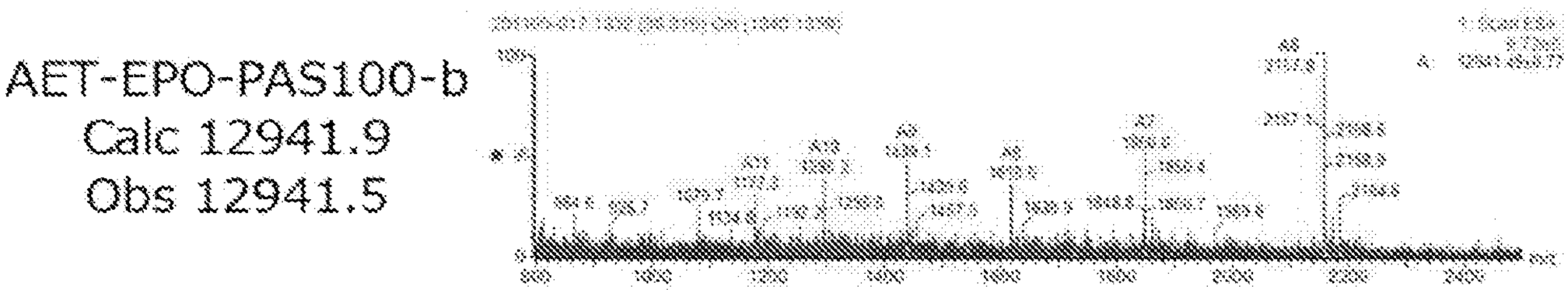
FIG.53

AET-EPO-PAS100
Calc 12703.4
Obs 12702.1



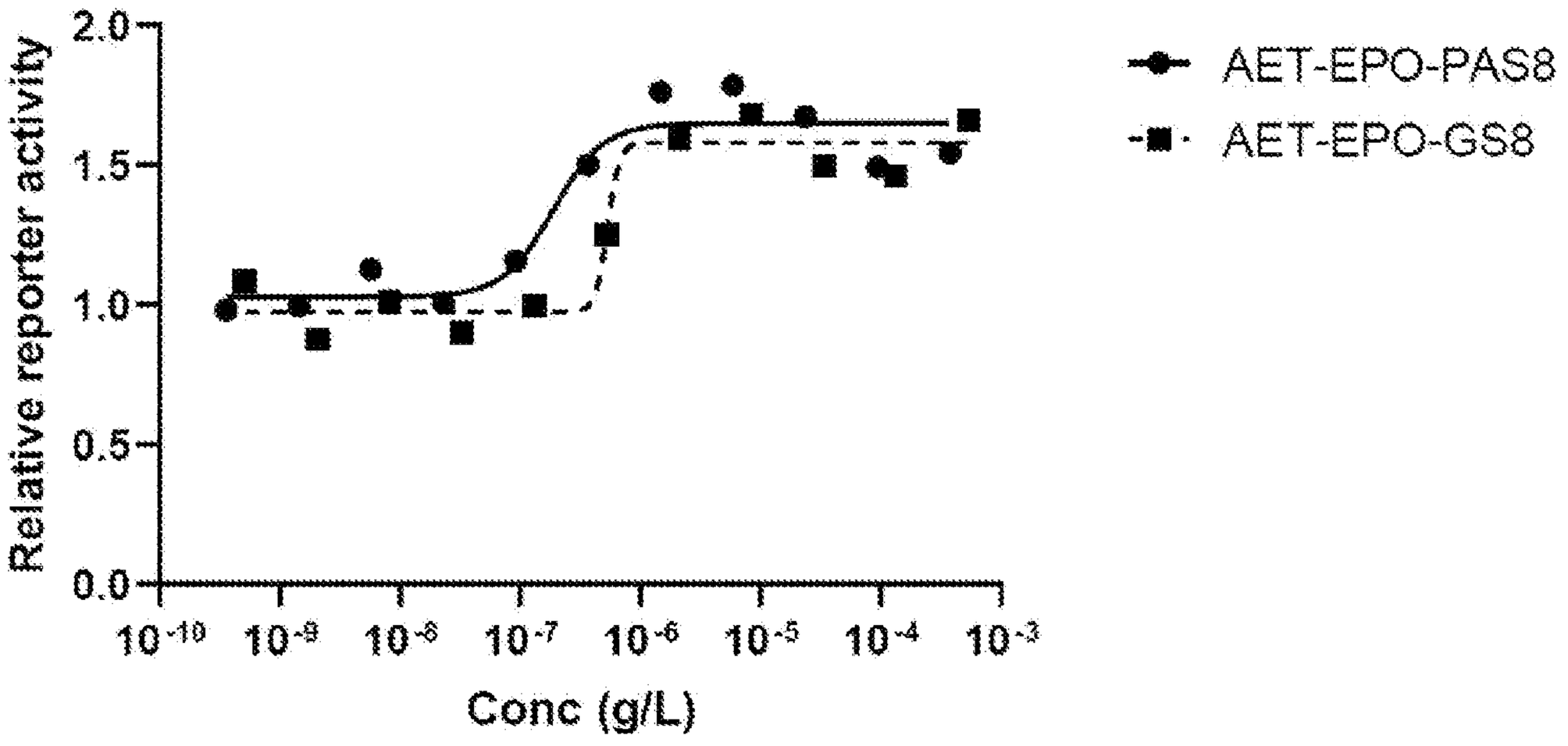
[図54]

FIG.54



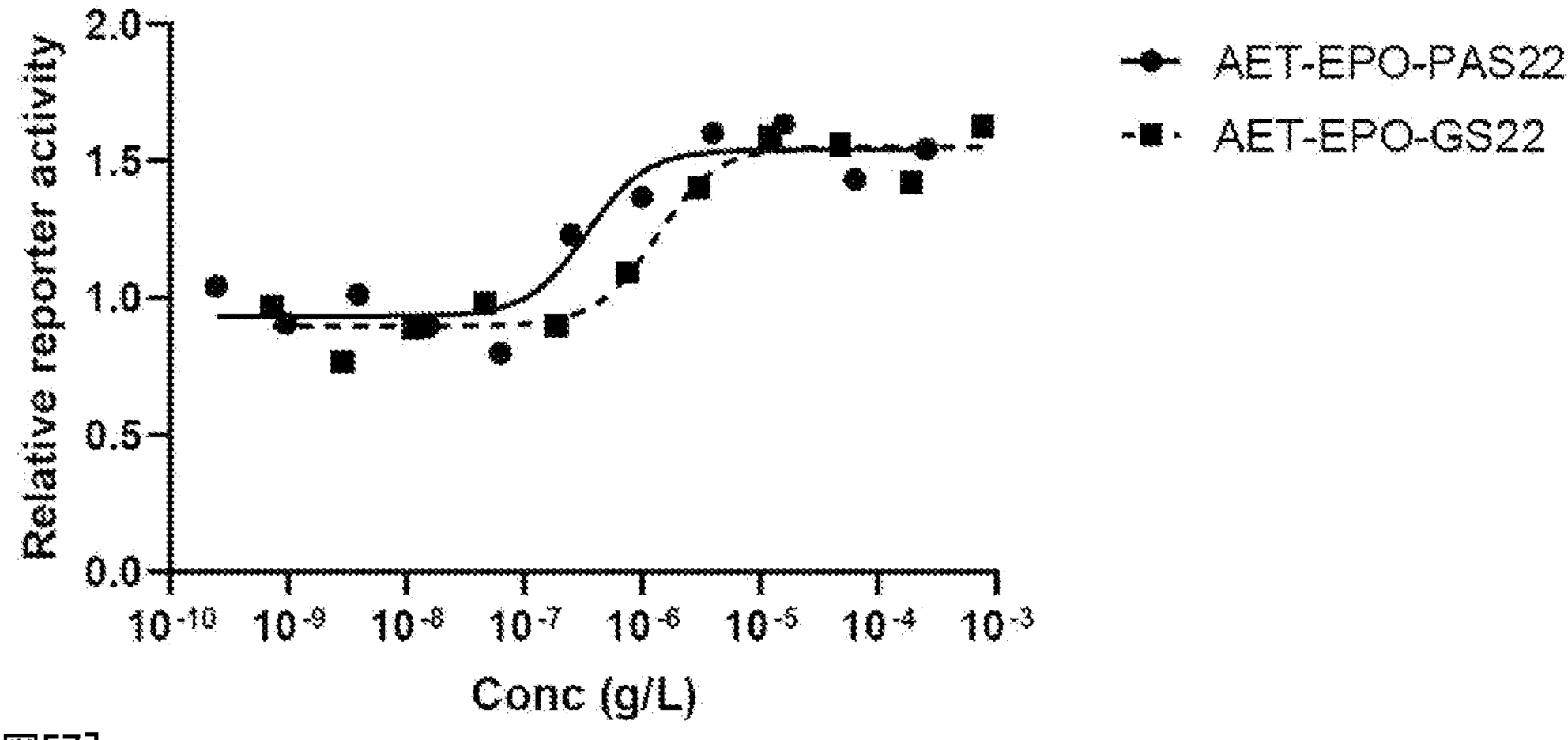
[図55]

FIG.55



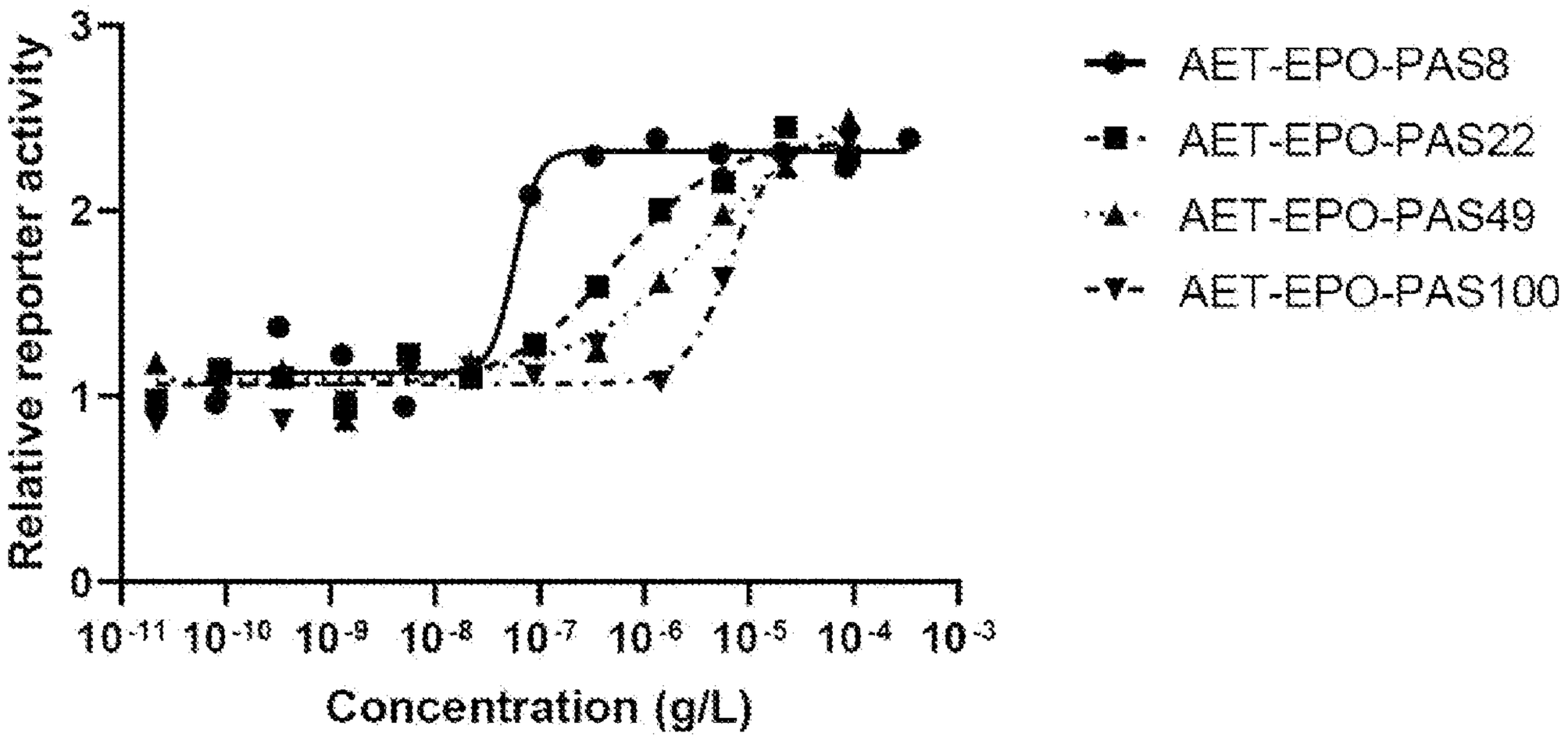
[図56]

FIG.56



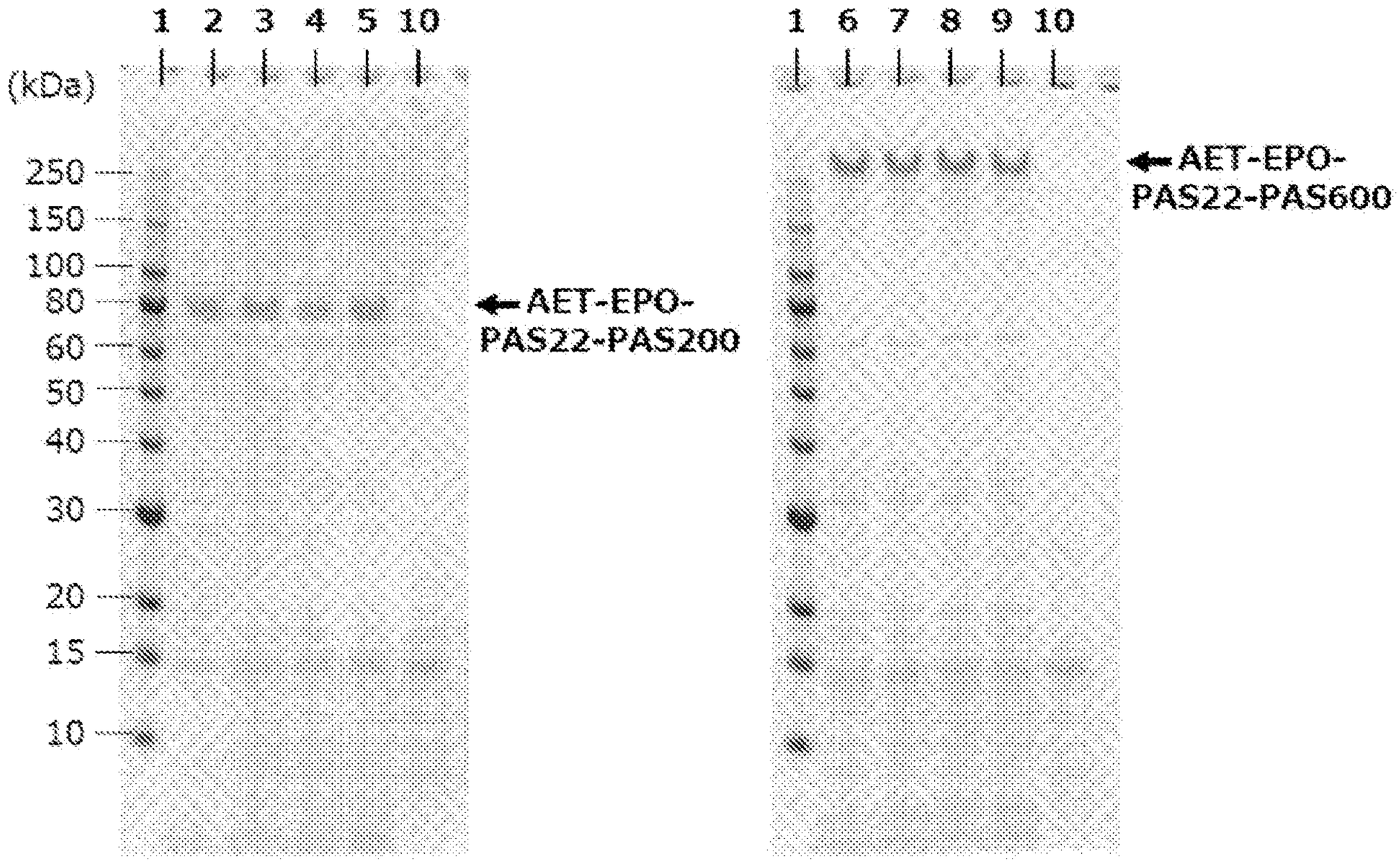
[図57]

FIG.57



[図58]

FIG.58

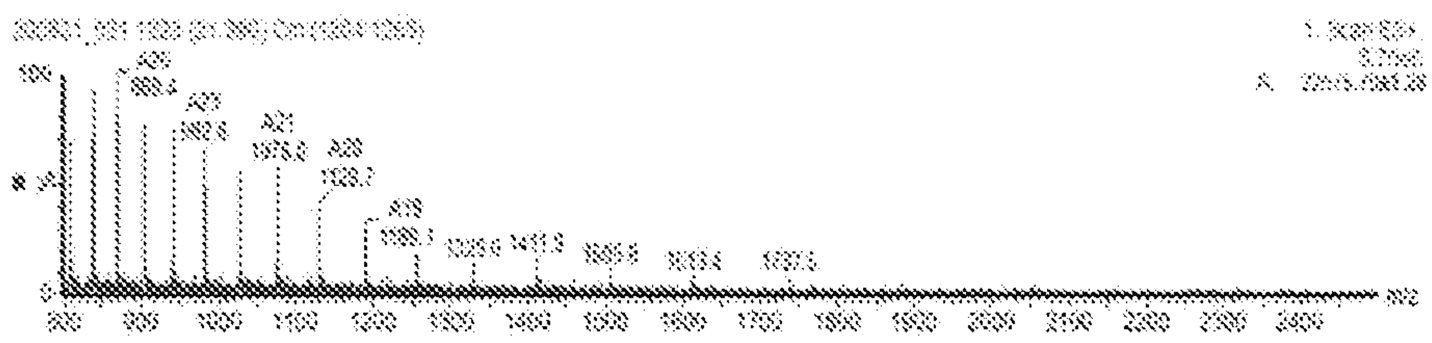


1, Marker (XL-Ladder Broad, APRO science)
2-5, pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS22-PAS200
6-9, pPK4_CspBss-AET-EPO-PAS22-PAS600
10, pPK4 (empty vector)

[図59]

FIG.59

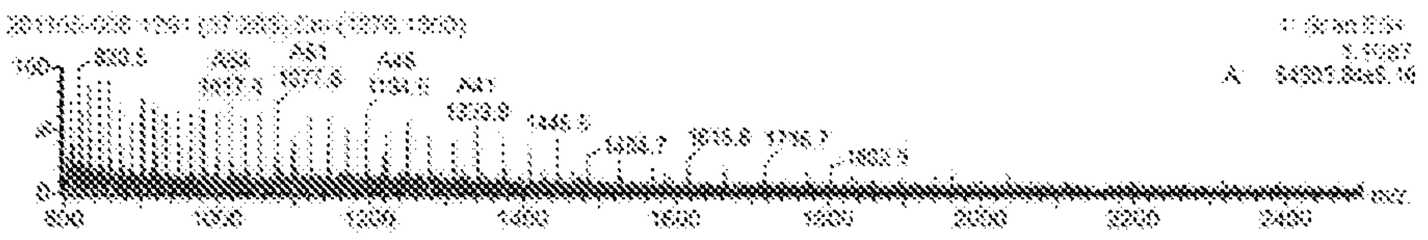
AET-EPO-PAS22-PAS200
Calc 22571.6
Obs 22575.7



[図60]

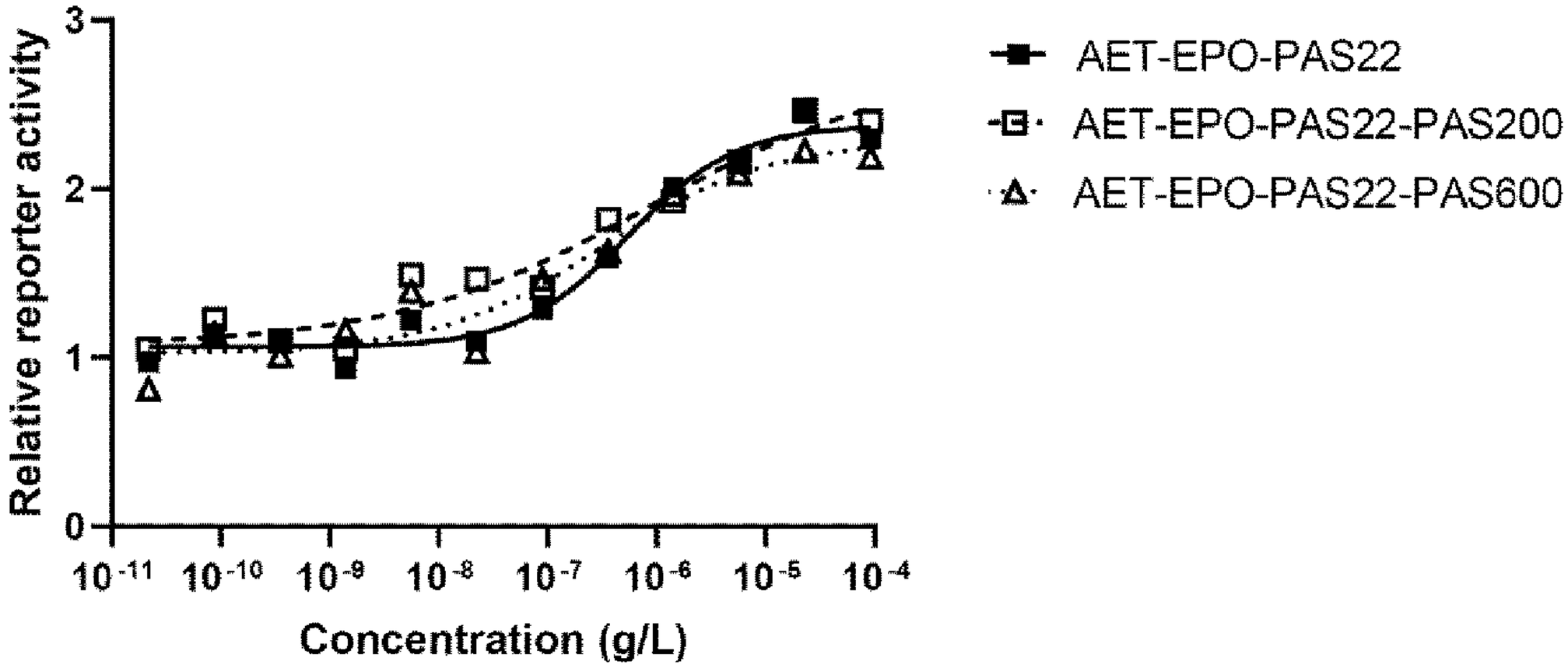
FIG.60

AET-EPO-PAS22-PAS600
Calc 54907.9
Obs 54903.8



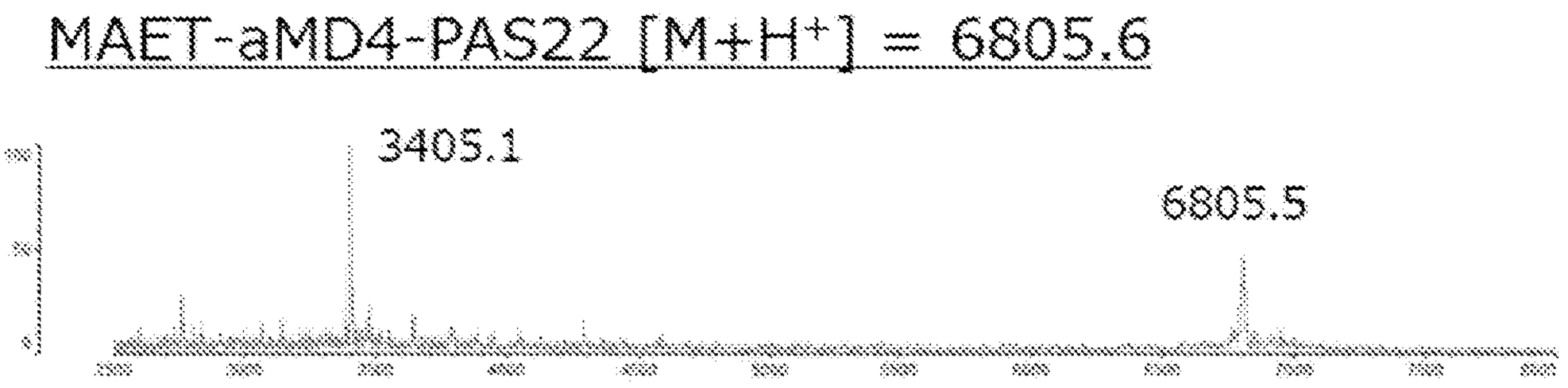
[図61]

FIG.61



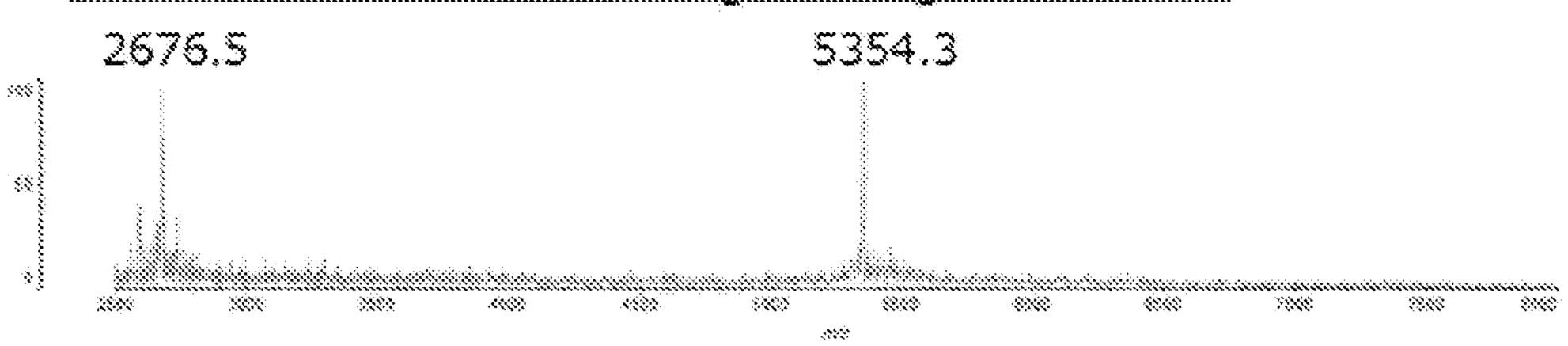
[図62]

FIG.62



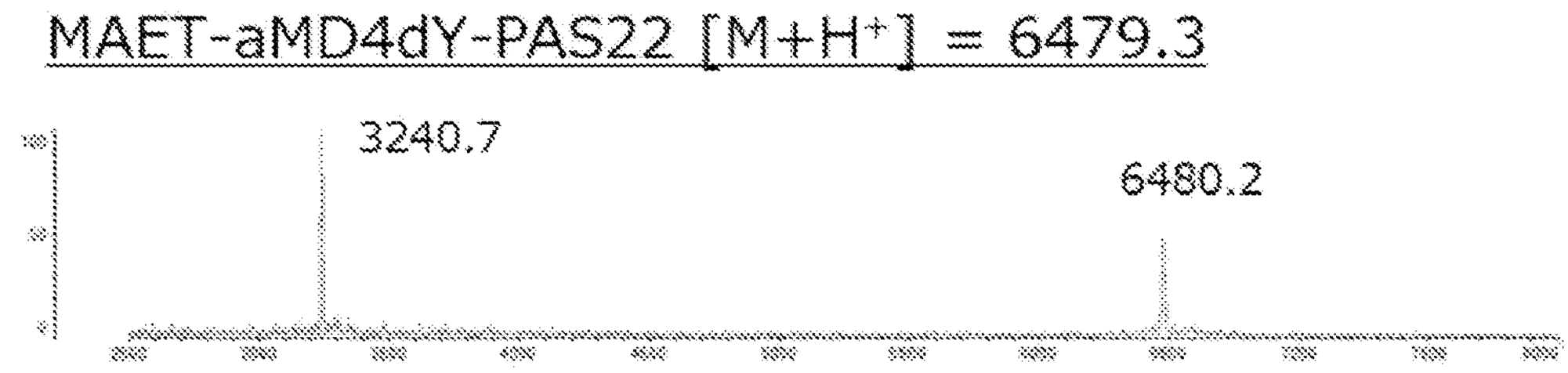
[図63]

FIG.63



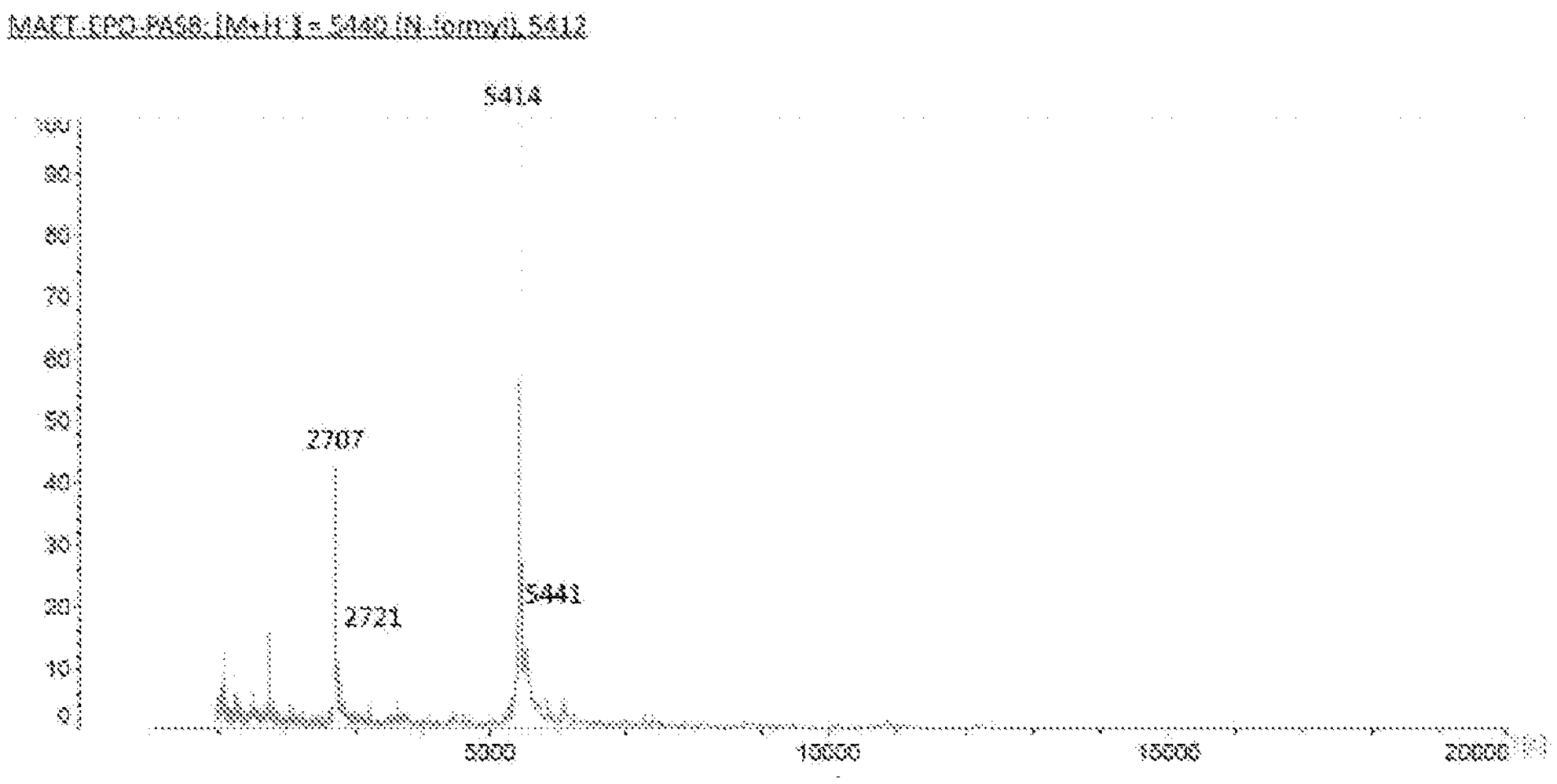
[図64]

FIG.64



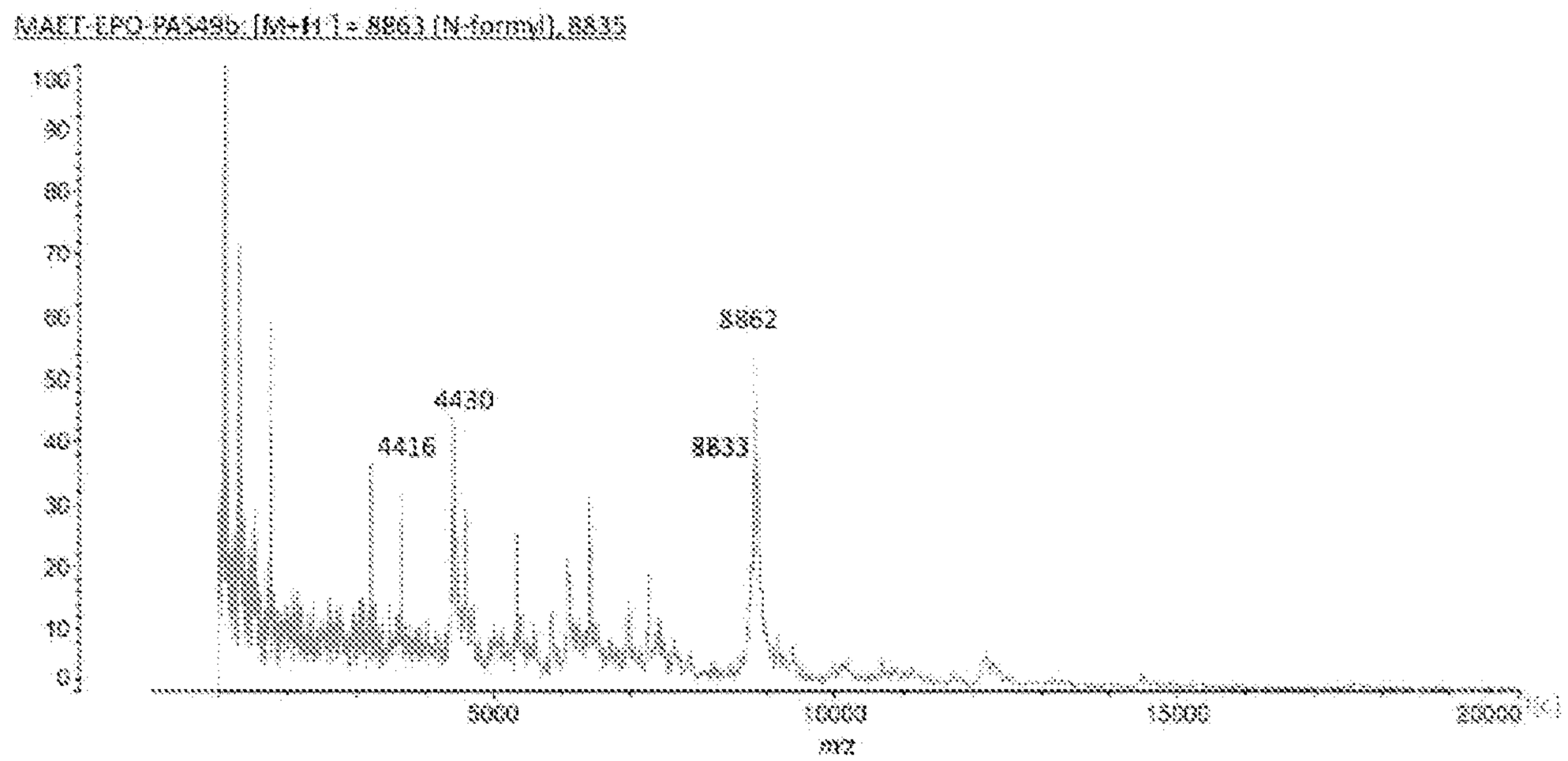
[図65]

FIG.65



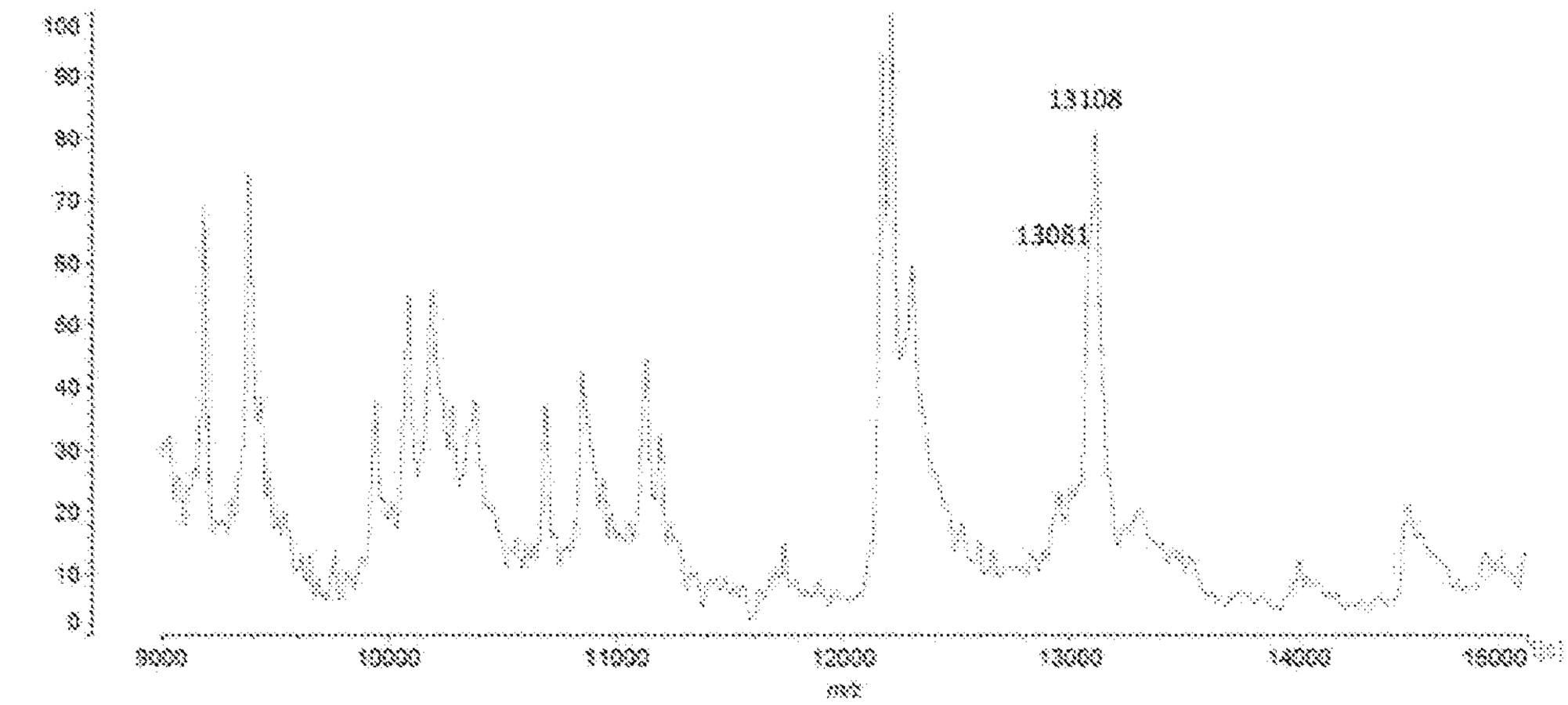
[図66]

FIG.66



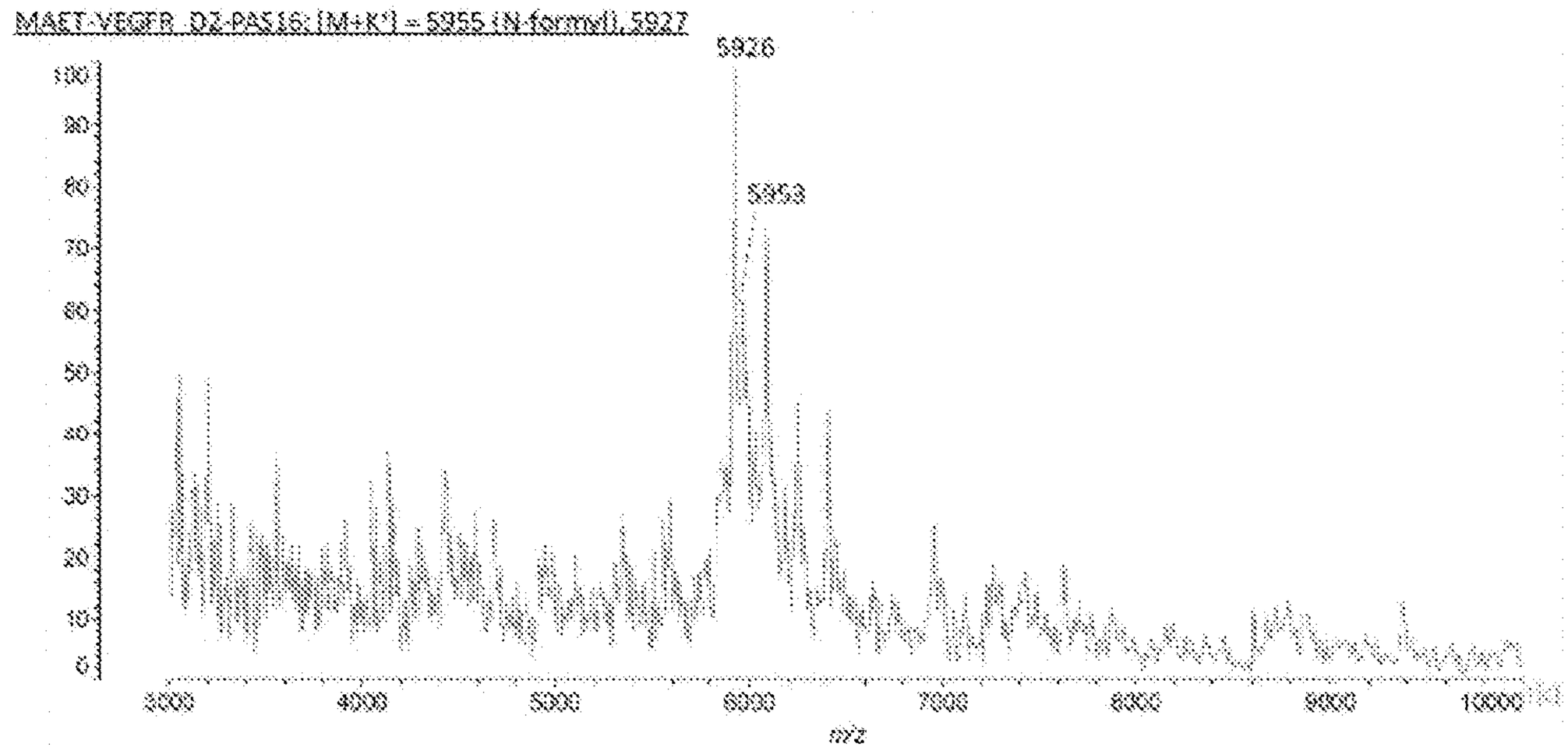
[図67]

FIG.67



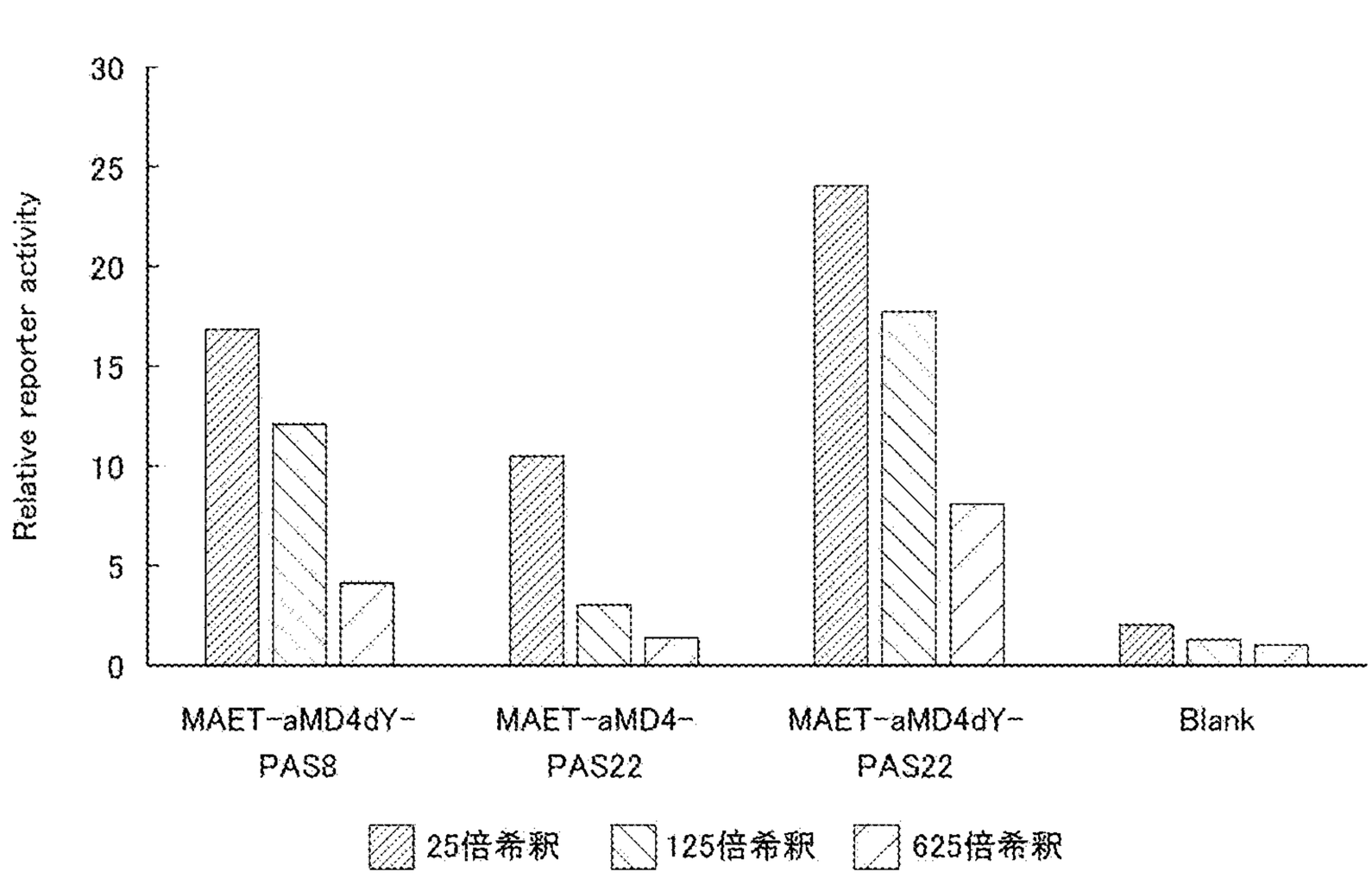
[図68]

FIG.68



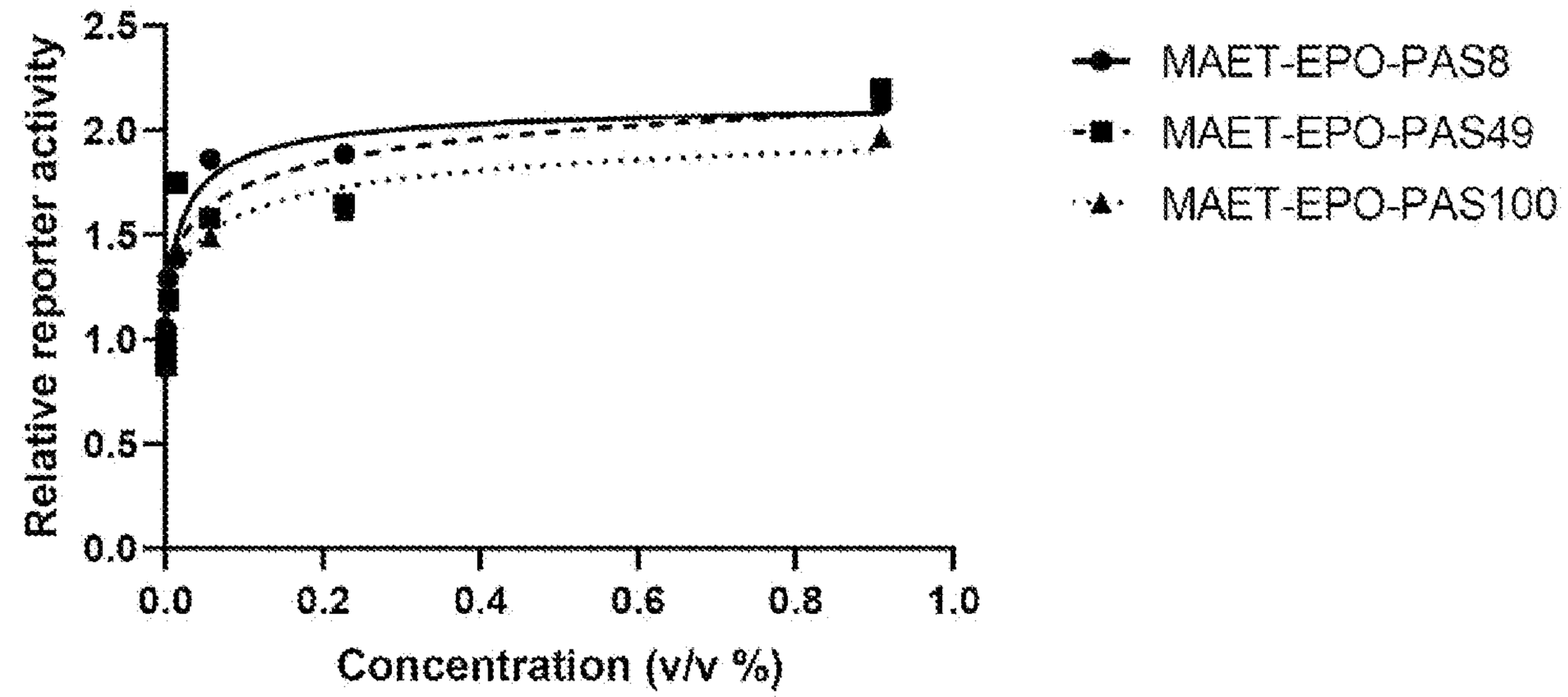
[図69]

FIG.69



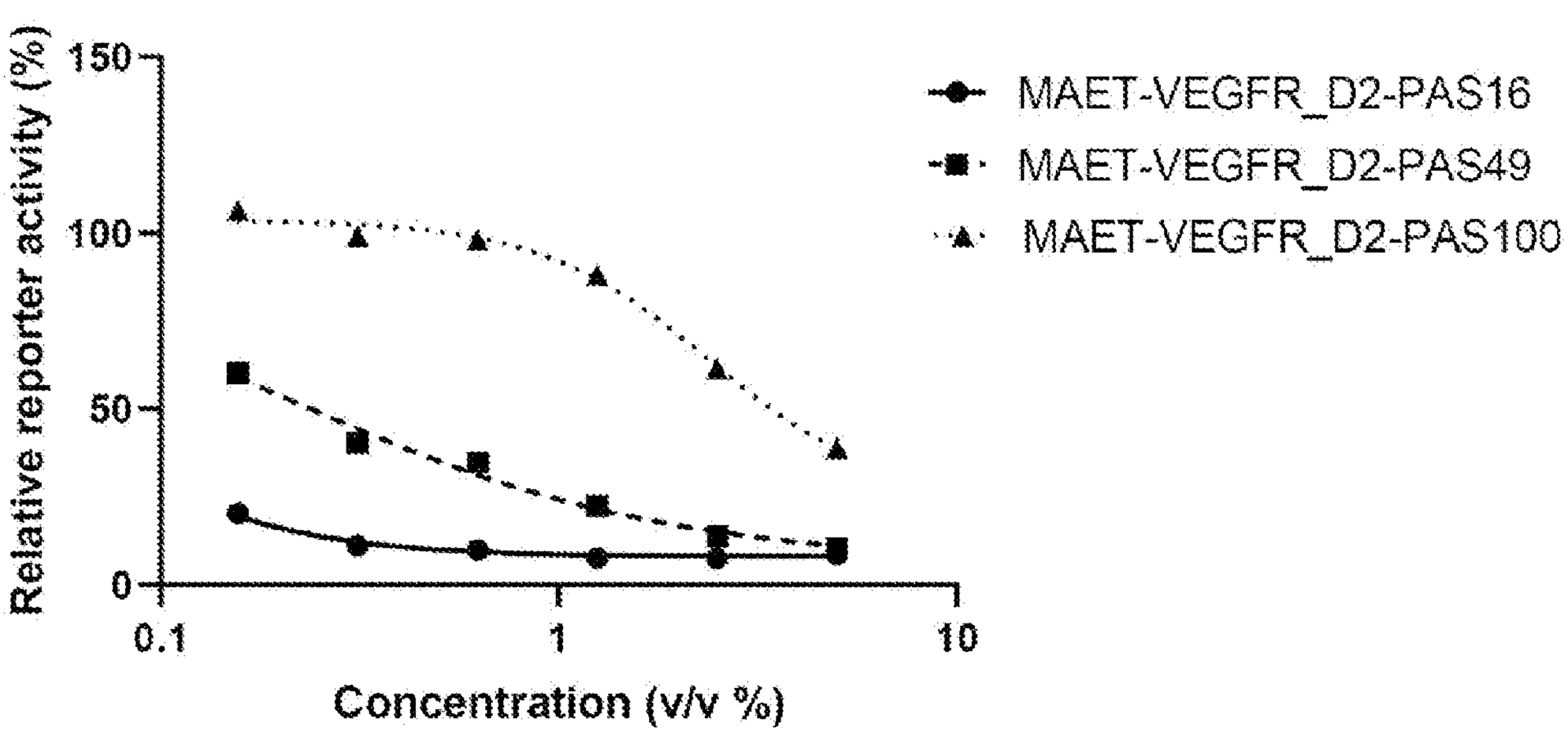
[図70]

FIG.70



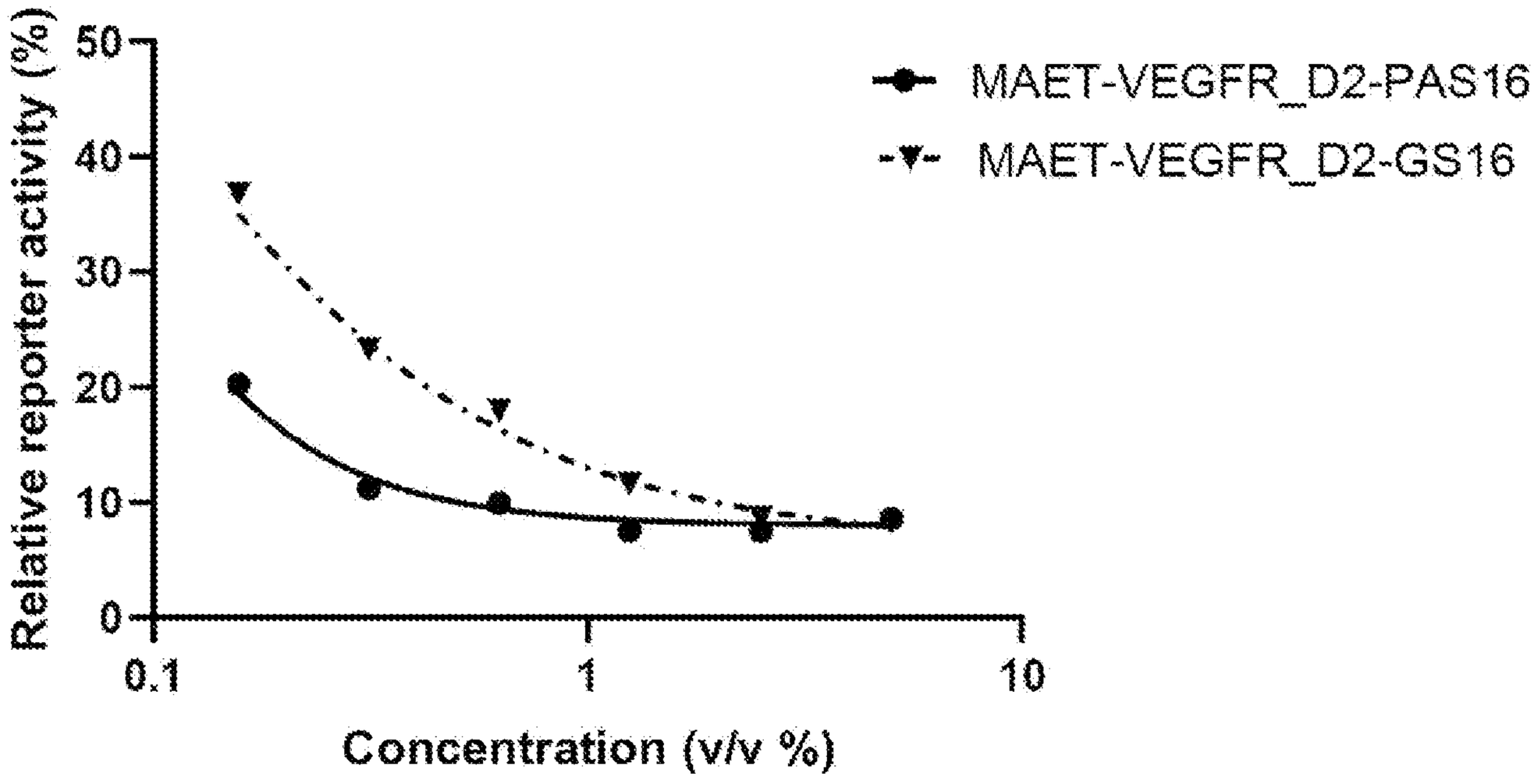
[図71]

FIG.71



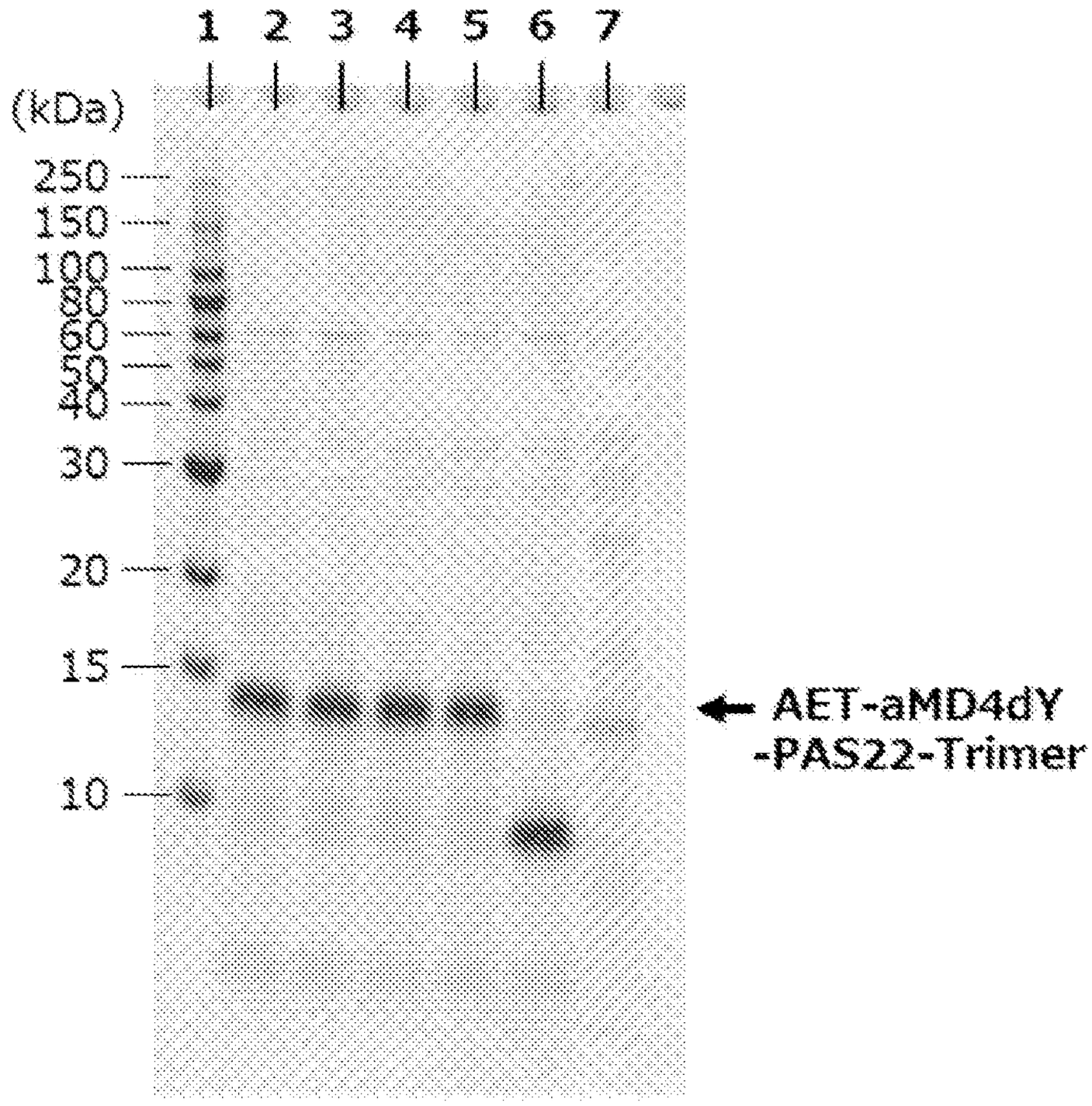
[図72]

FIG.72


MAET-VEGFR_D2-PAS16
MAET-VEGFR_D2-GS16
Relative reporter activity (%)
50
40
30
20
10
0
0.1
1
10
Concentration (v/v %)

[図73]

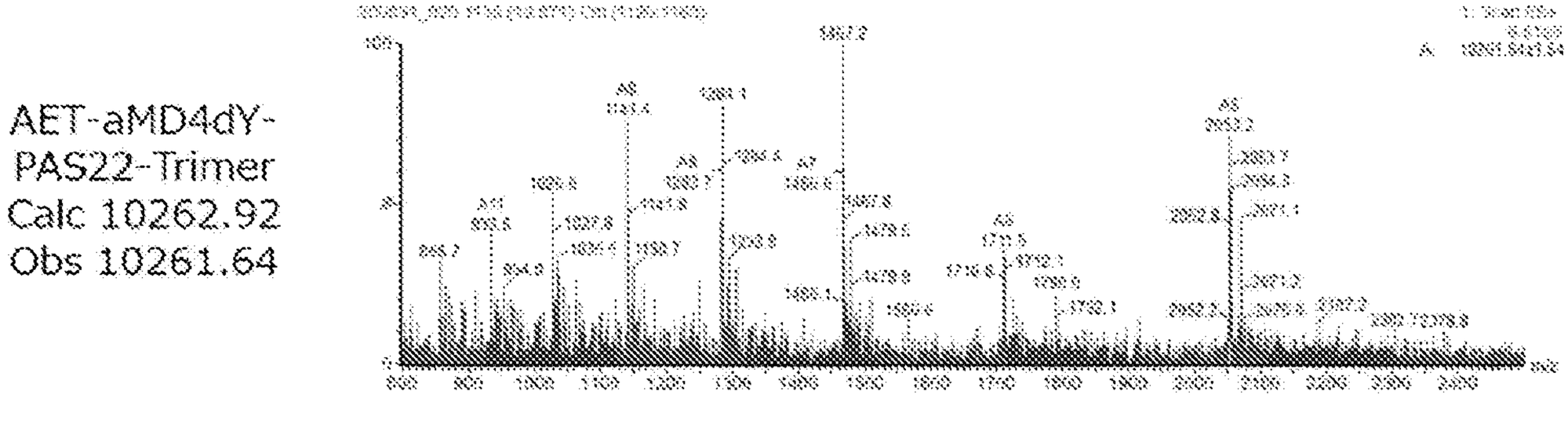
FIG.73



1, Marker (XL-Ladder Broad, APRO science)
2-5, pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS22-Trimer
6, pPK4_CspBss-AET-aMD4dY-PAS22
7, pPK4 (empty vector)

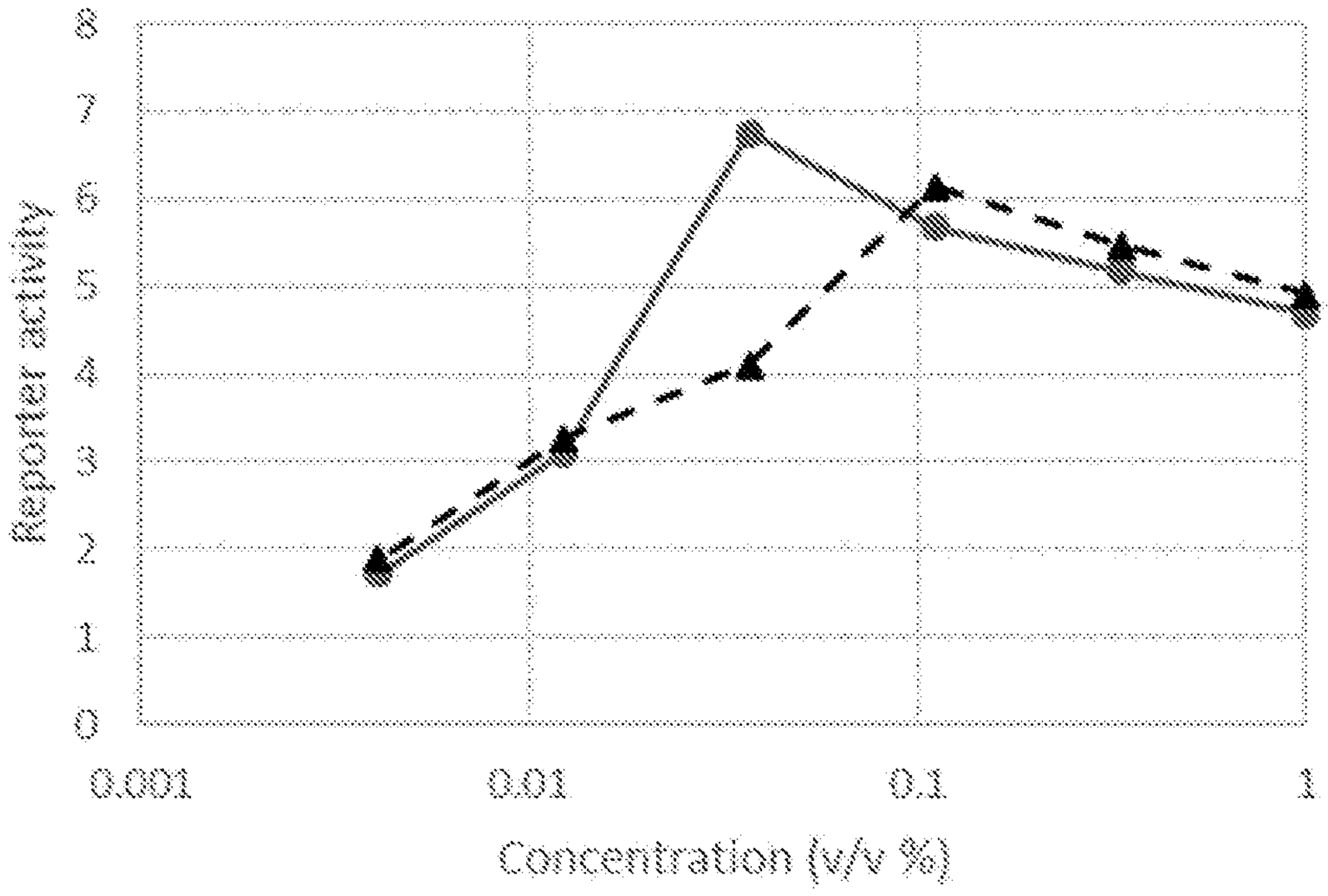
[図74]

FIG.74



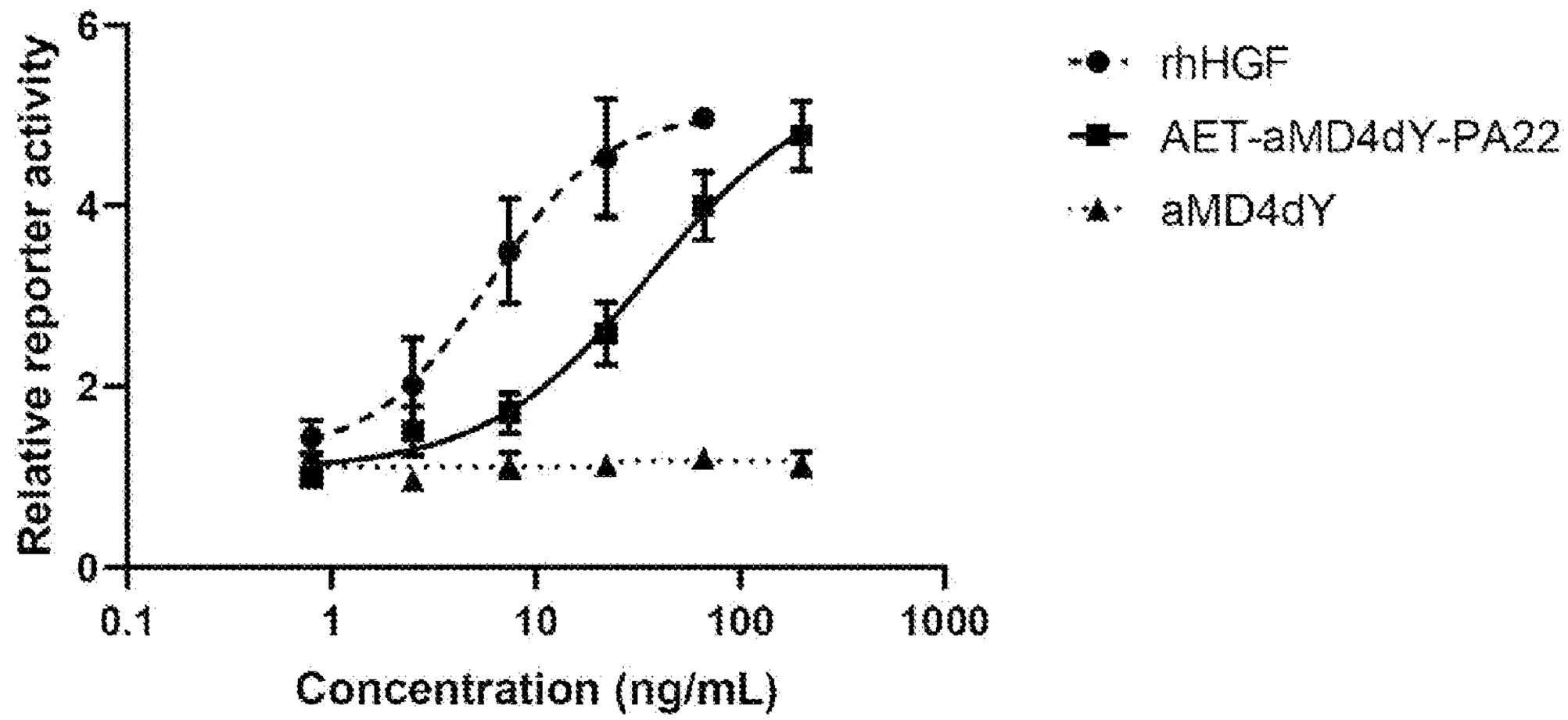
[図75]

FIG.75



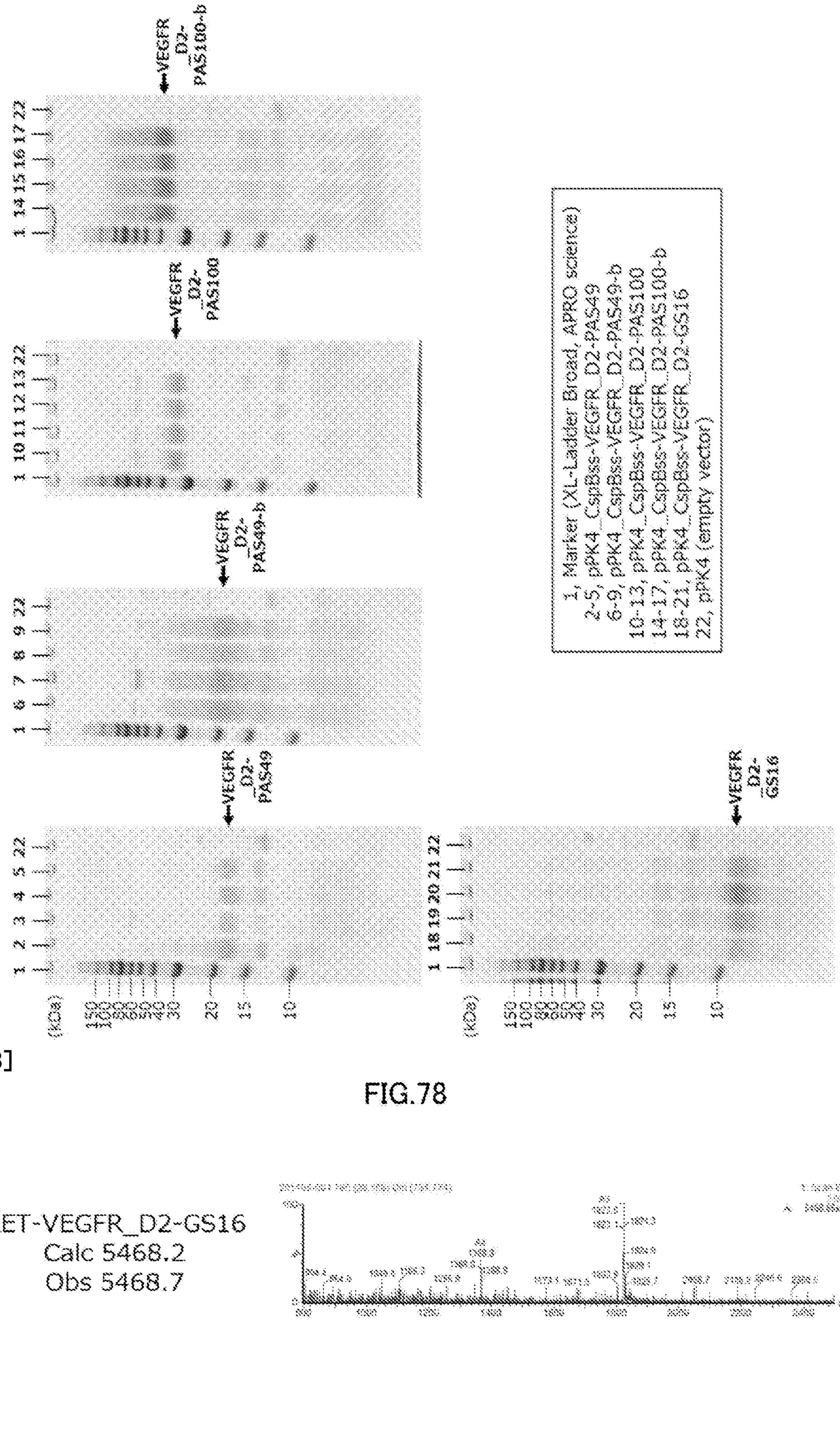
[図76]

FIG.76



[図77]

FIG.77



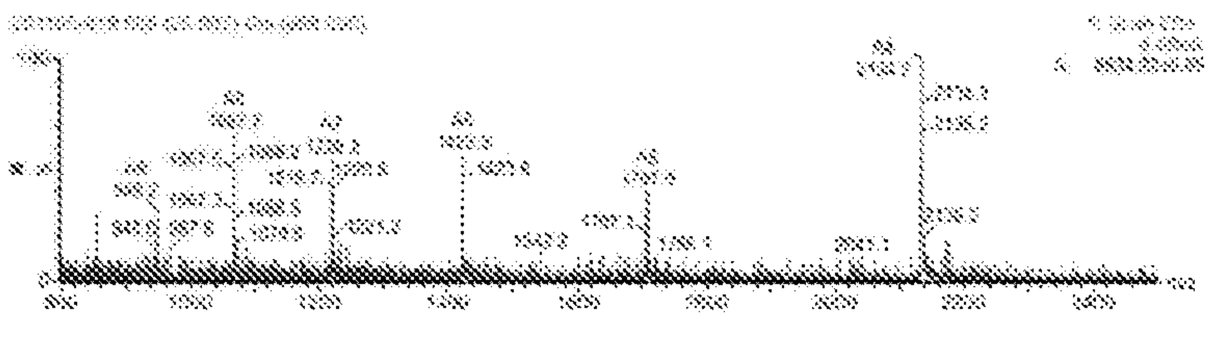
[図78]

FIG.78

[図79]

FIG.79

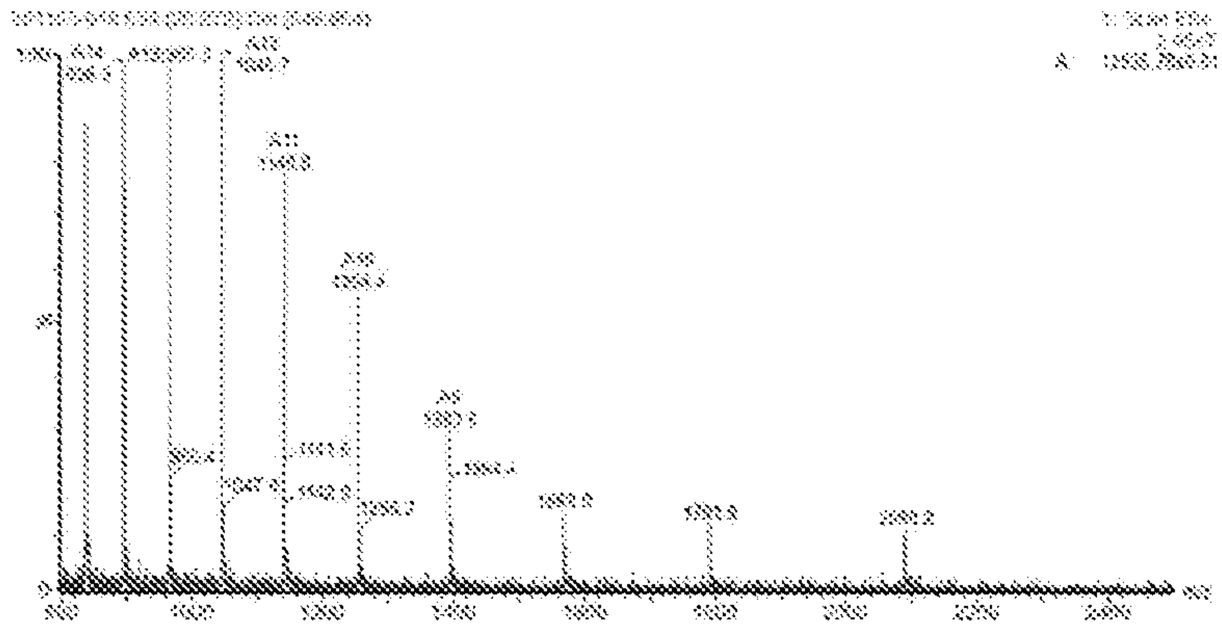
AET-VEGFR_D2-PAS49b
Calc 8533.6
Obs 8534.2



[図80]

FIG.80

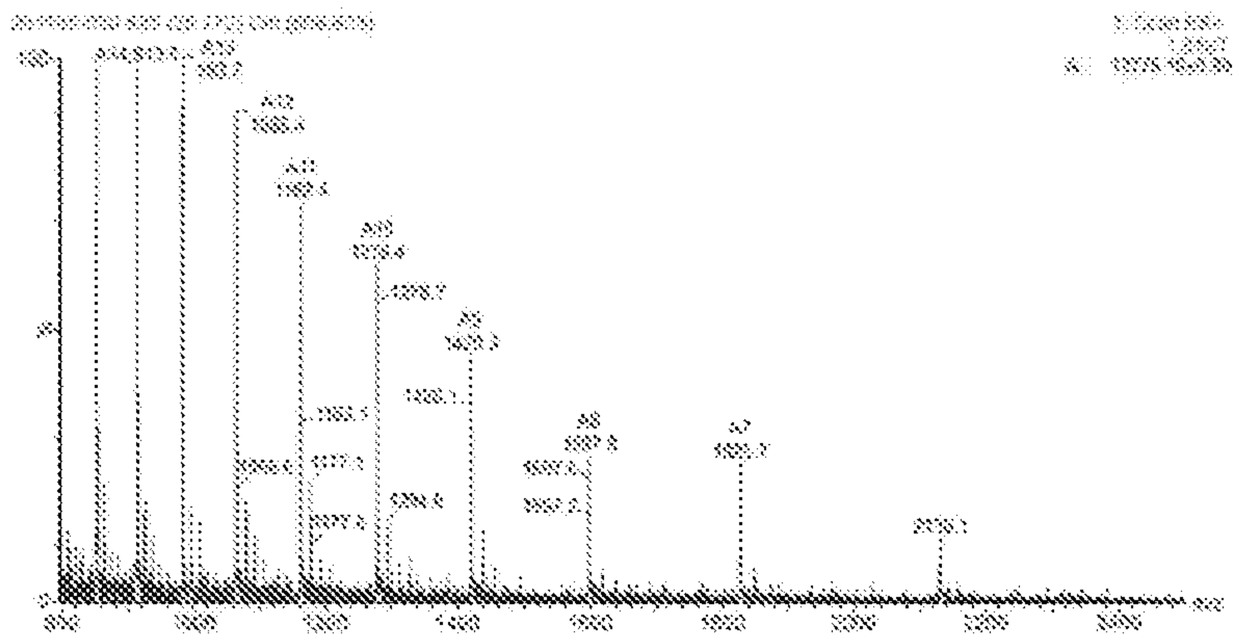
AET-VEGFR_D2-PAS100
Calc 12536.1
Obs 12535.8



[図81]

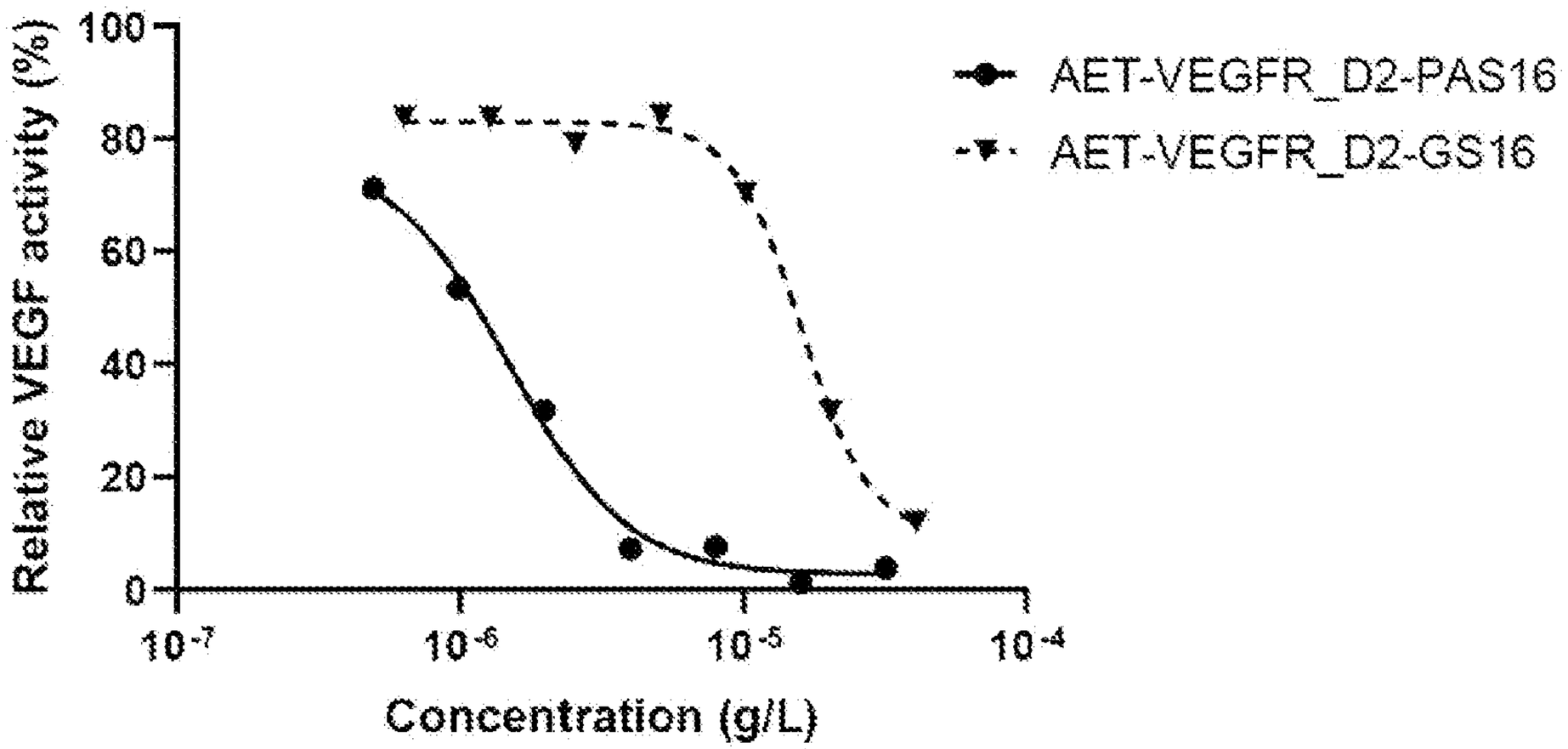
FIG.81

AET-VEGFR_D2-PAS100b
Calc 12774.6
Obs 12775.1



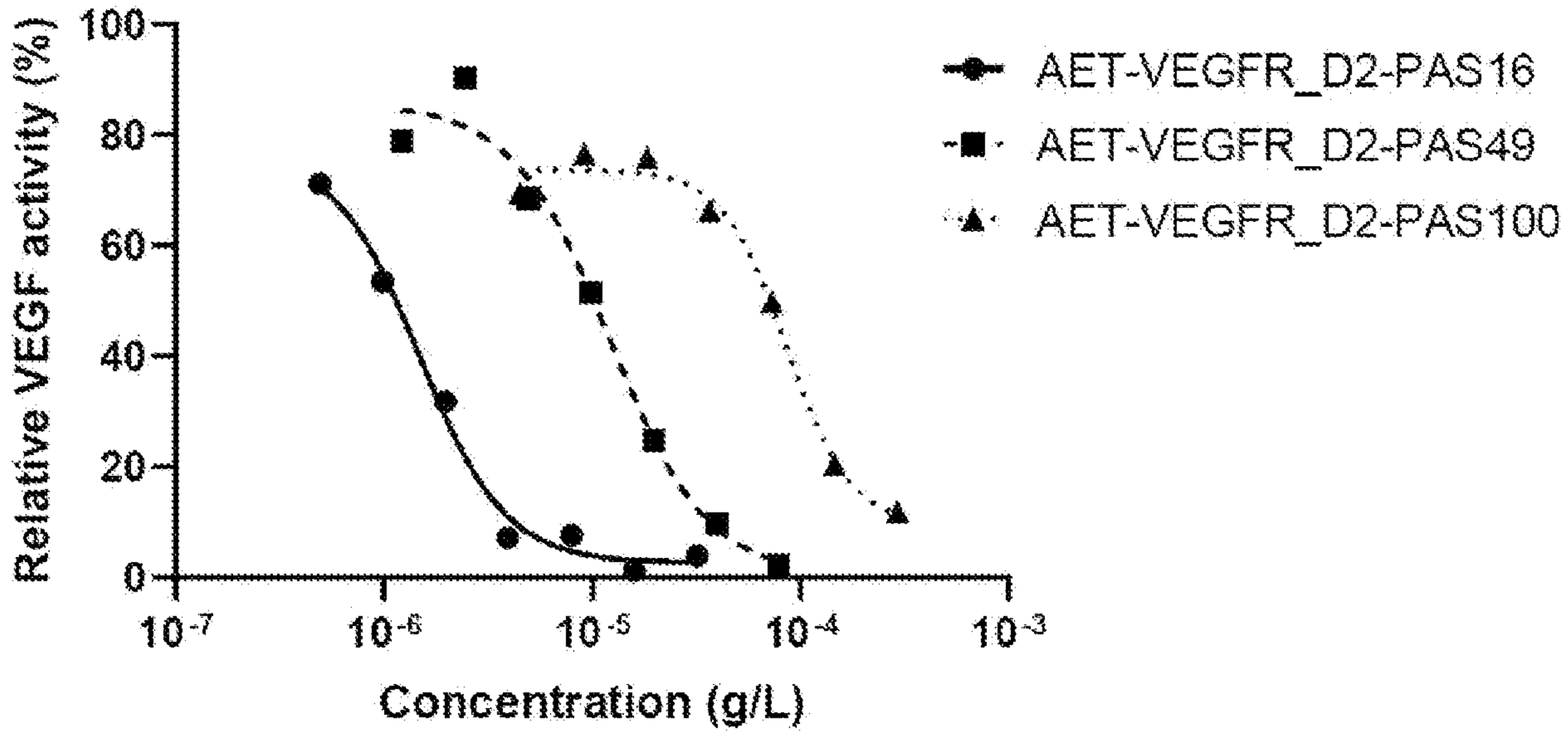
[図82]

FIG.82



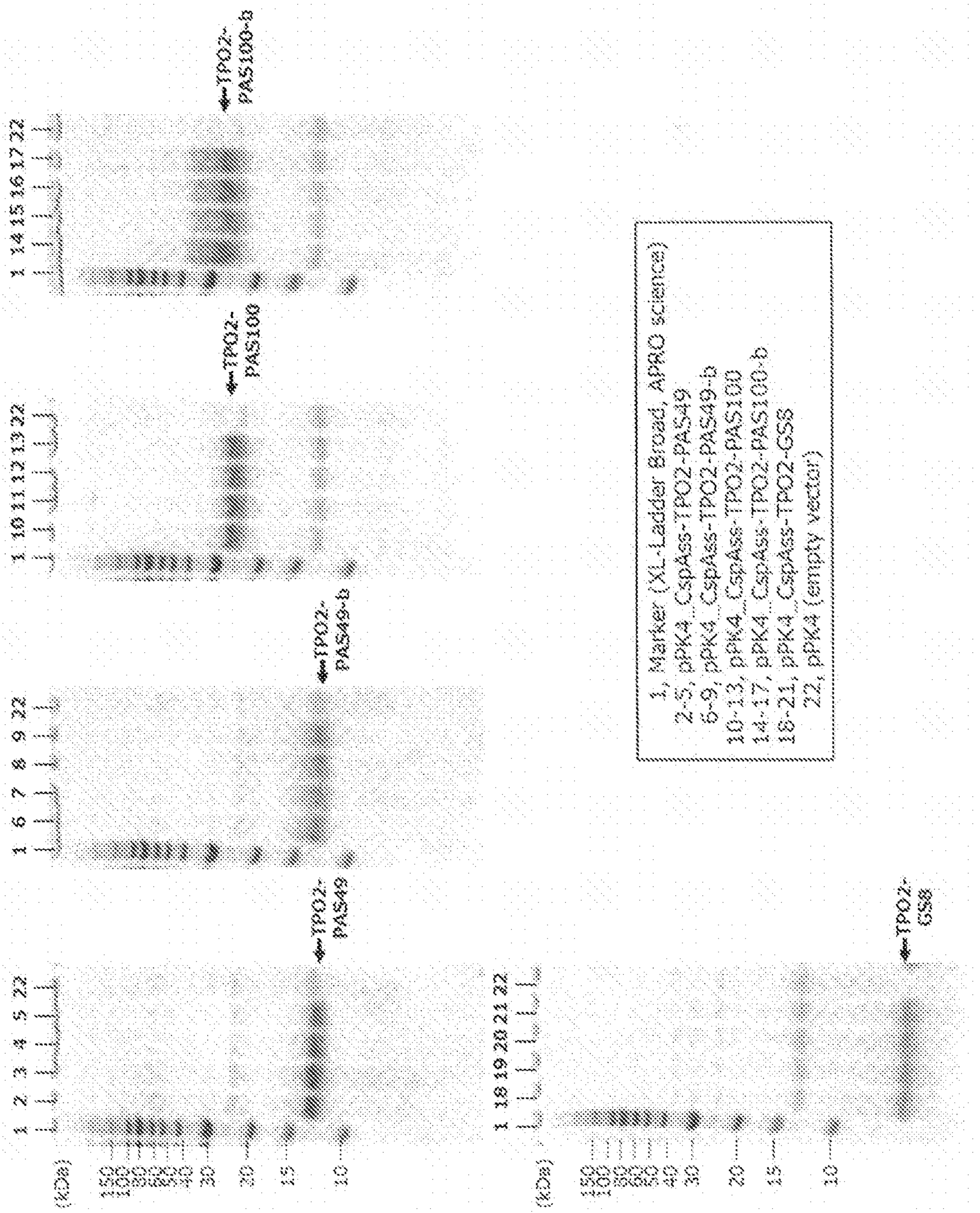
[図83]

FIG.83



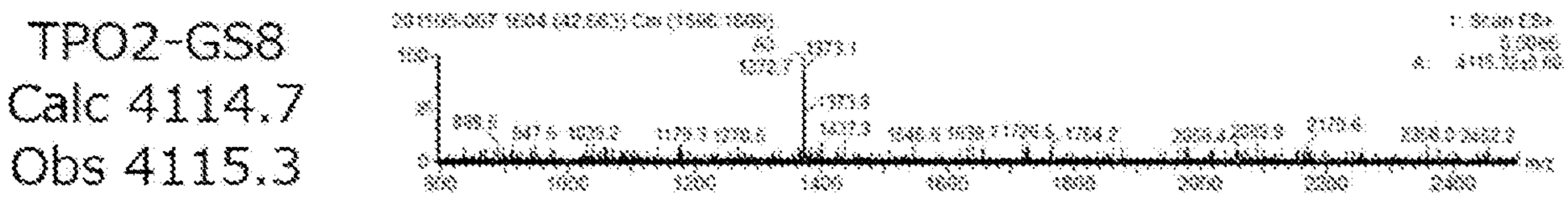
[図84]

FIG.84



[図85]

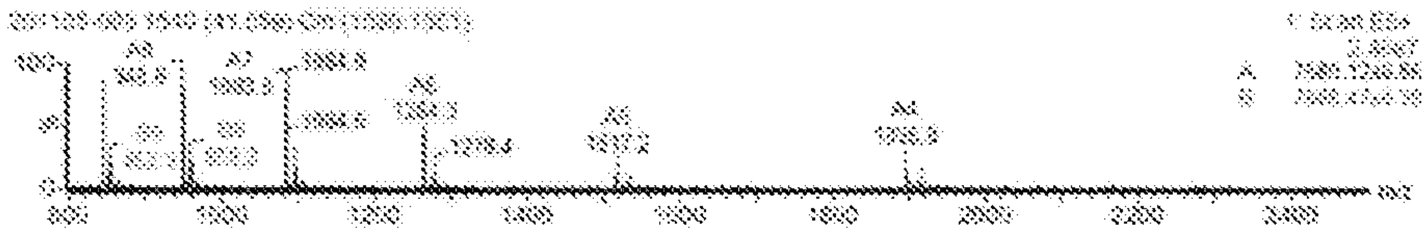
FIG.85



[図86]

FIG.86

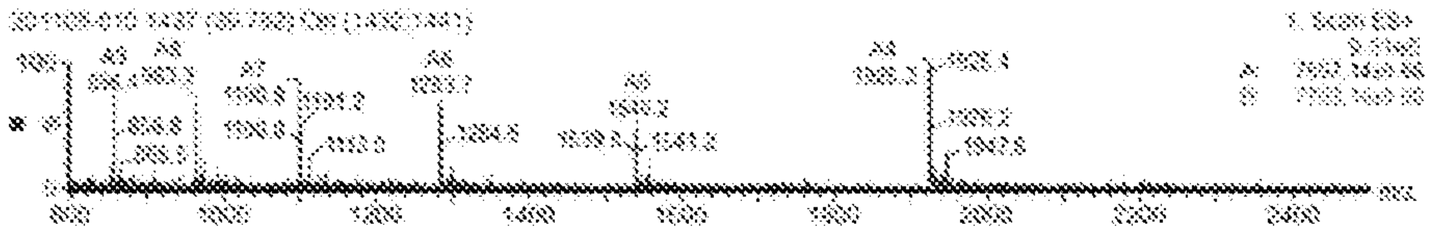
TPO2-PAS49
Calc 7579.7
Obs 7580.1



[図87]

FIG.87

TPO2-PAS49b
Calc 7697.4
Obs 7697.1



[図88]

FIG.88

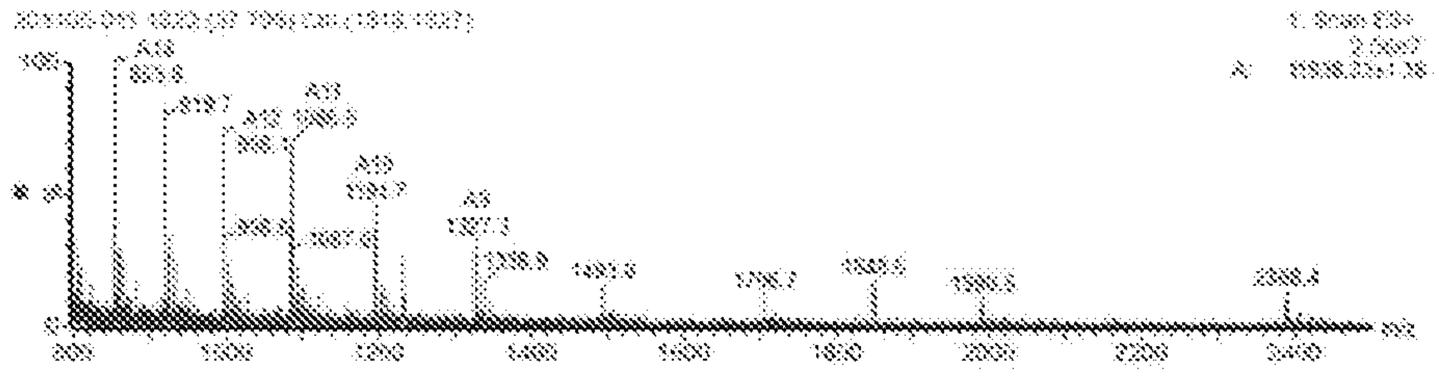
TPO2-PAS100
Calc 11698.9
Obs 11699.5



[図89]

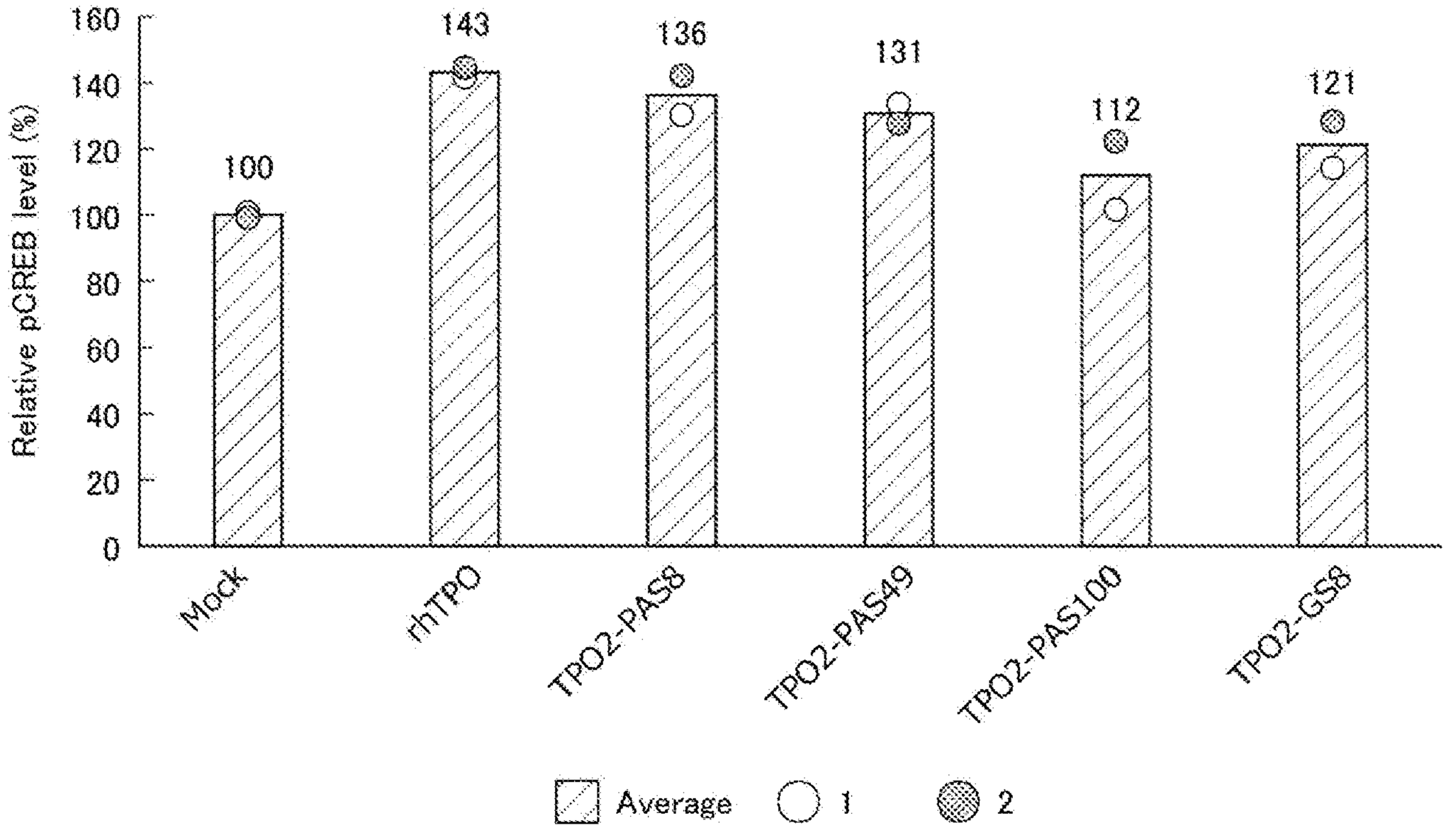
FIG.89

TPO2-PAS100b
Calc 11938.4
Obs 11938.3



[図90]

FIG.90


Relative pCREB level (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
100
143
136
131
112
121
Mock
rhTPO
TPO2-PAS8
TPO2-PAS49
TPO2-PAS100
TPO2-GS8
Average
1
2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/045327

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i
FI: C07K19/00 ZNA; C12P21/02 C; C12N15/62 Z
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K19/00; C12N15/62; C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII);
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2014-534265 A (PHASEBIO PHARMACEUTICALS, INC.) 18 December 2014 (2014-12-18) claims, paragraphs [0019], [0031]	13, 17
X	JP 2010-521980 A (BIOCOMPATIBLES UK LTD.) 01 July 2010 (2010-07-01) claims	13, 17
Y	WO 2015/056713 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 23 April 2015 (2015-04-23) claims	1-19
Y	JP 2018-172415 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 08 November 2018 (2018-11-08) paragraph [0190]	1-19
Y	JP 2019-509054 A (MEDITOPE BIOSCIENCES, INC.) 04 April 2019 (2019-04-04) paragraph [0129]	1-19
Y	JP 2010-83808 A (INST OF PHYSICAL & CHEMICAL RES) 15 April 2010 (2010-04-15) claims	8-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 January 2021 (29.01.2021)	09 February 2021 (09.02.2021)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/045327

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2014-534265 A	18 Dec. 2014	WO 2013/082116 A1 claims, paragraphs [0035], [0047] US 2013/0150291 A1 EP 2785367 A1 CN 104080473 A KR 10-2014-0103985 A	
JP 2010-521980 A	01 Jul. 2010	WO 2008/116648 A2 claims US 2010/0256332 A1 EP 1975176 A2	
WO 2015/056713 A1	23 Apr. 2015	US 2016/0237119 A1 claims EP 3059244 A1	
JP 2018-172415 A	08 Nov. 2018	WO 2013/185032 A1 paragraph [0202] US 2015/0147276 A1 EP 2858630 A1 CN 104684546 A	
JP 2019-509054 A	04 Apr. 2019	WO 2017/120599 A1 paragraph [0129] US 2019/0016822 A1 EP 3399992 A1 KR 10-2018-0098672 A CN 108712908 A	
JP 2010-83808 A	15 Apr. 2010	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2020/045327

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i
FI: C07K19/00 ZNA; C12P21/02 C; C12N15/62 Z

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K19/00; C12N15/62; C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2014-534265 A (フェーズバイオ ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド) 18.12.2014 (2014-12-18) 特許請求の範囲、［００１９］、［００３１］	13, 17
X	JP 2010-521980 A (バイオコンパティブルズ ユーケー リミテッド) 01.07.2010 (2010-07-01) 特許請求の範囲	13, 17
Y	WO 2015/056713 A1 (国立大学法人東京大学) 23.04.2015 (2015-04-23) 特許請求の範囲	1-19
Y	JP 2018-172415 A (プレジデント・アンド・フェロウズ・オブ・ハーバード・カレッジ) 08.11.2018 (2018-11-08) ［０１９０］	1-19
Y	JP 2019-509054 A (メディトープ バイオサイエンシーズ インク.) 04.04.2019 (2019-04-04) ［０１２９］	1-19
Y	JP 2010-83808 A (独立行政法人理化学研究所) 15.04.2010 (2010-04-15) 特許請求の範囲	8-12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
29.01.2021	09.02.2021

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
川合　理恵 4N 4046
電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/045327

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2020/045327

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2014-534265 A	18.12.2014	WO 2013/082116 A1 特許請求の範囲、［００３５］、［００４７］ US 2013/0150291 A1 EP 2785367 A1 CN 104080473 A KR 10-2014-0103985 A	
JP 2010-521980 A	01.07.2010	WO 2008/116648 A2 特許請求の範囲 US 2010/0256332 A1 EP 1975176 A2	
WO 2015/056713 A1	23.04.2015	US 2016/0237119 A1 特許請求の範囲 EP 3059244 A1	
JP 2018-172415 A	08.11.2018	WO 2013/185032 A1 ［０２０２］ US 2015/0147276 A1 EP 2858630 A1 CN 104684546 A	
JP 2019-509054 A	04.04.2019	WO 2017/120599 A1 ［０１２９］ US 2019/0016822 A1 EP 3399992 A1 KR 10-2018-0098672 A CN 108712908 A	
JP 2010-83808 A	15.04.2010	（ファミリーなし）	